

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
15 juillet 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/059302 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :

G01N 21/64

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : SOUS-
SALINE, Françoise [FR/FR]; Rue Cassini, 1, F-75014
Paris (FR). KHOMYAKOVA, Elena [RU/FR]; 5, rue Paul
Louis Courier, F-75007 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/003886

(22) Date de dépôt international :

23 décembre 2003 (23.12.2003)

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

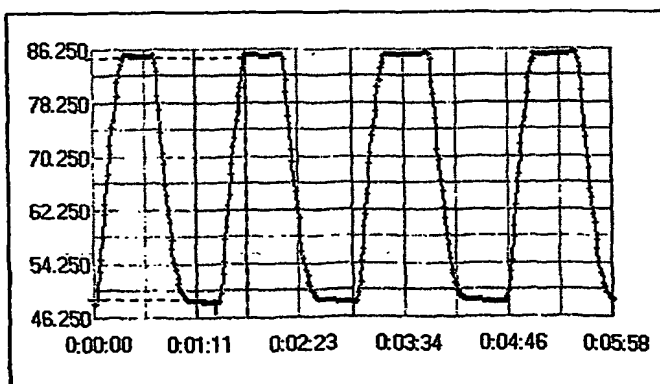
02/16500 23 décembre 2002 (23.12.2002) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : IM-
STAR IMAGE ET MODELISATION: STRATEGIE,
ANALYSE ET REALISATION [FR/FR]; 60, rue
Notre-Dame des Champs, F-75006 Paris (FR).(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: CHIP READER FOR BIOCHIPS AND ASSOCIATED METHODS

(54) Titre : LECTEUR DE PUCES DE TYPE BIOPUCES, ET PROCEDES ASSOCIES

AA... Chauffage 2.3 °C/s
Refroidissement 2.3 °C/sAA... CHAUFFAGE: HEATING
REFROIDISSEMENT: COOLING

(57) Abstract: The invention relates to a device which is used to read and analyse chips. The inventive device comprises a table (11) for receiving a chip (12) that is intended to characterise at least one sample, means of exciting the molecules or cells of the chip after reaction with other molecules and means (14) of reading and analysing the molecules subjected to excitation. The invention is characterised in that the device also comprises: a unit (15) for controlling the temperature of the aforementioned table, said control unit being connected to a module (111) consisting of a plurality of Peltier-type heating/cooling elements which are disposed opposite different slots on the surface of the table; and at least one table temperature sensor (112) which is also connected to said control unit. The invention also relates to the associated methods.

(57) Abrégé : L'invention concerne un dispositif de lecture et analyse de puces, comprenant : une table (11) pour recevoir une puce (12) destinée à

caractériser au moins un échantillon, des moyens d'excitation des molécules ou des cellules de la puce, après réaction avec d'autres molécules, des moyens de lecture et d'analyse (14) des molécules soumises à excitation, caractérisé en ce que le dispositif comprend également : une centrale de commande de température (15) de ladite table, ladite centrale de commande étant reliée à un module (111) comportant une pluralité d'éléments de chauffage/refroidissement de type Peltier disposés en regard de différents emplacements de la surface de la table, et au moins un capteur de température de la table (112) également relié à ladite centrale de commande. L'invention concerne également des procédés associés.



eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :

- *avec rapport de recherche internationale*
- *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

LECTEUR DE PUCES DE TYPE BIOPUCES, ET PROCEDES ASSOCIES***Contexte général***

La présente invention concerne de manière générale la lecture et
5 l'interprétation de puces et plus particulièrement la détection d'hybrides
marqués par des molécules génératrices de signal, telles les fluorophores,
et formés entre les molécules constituant ces puces et des molécules ou
cellules provenant d'échantillons biologiques ou chimiques.

L'invention concerne ainsi selon un premier aspect un dispositif de
10 lecture et analyse de puces (ou lecteur de puces), comprenant :

- Une table pour recevoir une puce destinée à caractériser au moins un échantillon,
- Des moyens d'excitation des molécules ou des cellules de la puce, après réaction avec d'autres molécules,
- 15 • Des moyens de lecture et d'analyse des molécules soumises à excitation.

Plus particulièrement, l'invention fournit en outre un moyen de
contrôle de la température des puces, permettant ainsi de développer des
applications impliquant des changements de température de la puce.

20 Dans une application particulière, la puce est une puce à ADN ou
d'oligonucléotides, et le contrôle de la température permet de définir avec
précision la température d'hybridation de sondes oligonucléotidiques sur
ladite puce.

L'invention concerne également des procédés de mise en œuvre
25 d'un tel lecteur, notamment pour la détection de mutations génétiques.

Définitions

Avant de présenter les buts et caractéristiques de l'invention, on va
30 dans un premier temps définir certains termes qui seront employés dans ce
texte.

Par « réseau, micro-réseau, array, micro-array, puce, chip », termes qui seront employés indifféremment dans le présent texte, on entend définir un réseau de cellules ou de molécules biologiques ou chimiques
5 disposées sur un support solide en des emplacements particuliers (formant par exemple une matrice).

Les molécules ou cellules sont typiquement fixées sur des emplacements respectifs d'un support solide revêtu d'un polymère et disposées de sorte que chacun des emplacements soit de la sorte associé
10 à une molécule/cellule qui présente une spécificité par rapport aux molécules/cellules des autres emplacements.

Lorsque le réseau comprend des molécules biologiques telles que des acides nucléiques ou des peptides, on parle de bio-puce.

Plus précisément, lorsque le réseau est constitué de
15 désoxyribonucléotides, on parle de puce à ADN ou de puce à oligonucléotides.

Le support solide est choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon®, en Kevlar®, en silicone, en silicium, ou encore en polyoses ou poly(hétéro-oses), tel que la cellulose.

20 De préférence il s'agit du verre. Ce support pourra être de forme quelconque (lame plane, microbilles, ...) mais selon un mode préféré le support est un plan, et il s'agit d'une lame plane en verre.

Lorsque la puce est mise en contact avec un échantillon dans des conditions appropriées, certains composants de l'échantillon peuvent réagir
25 sélectivement avec (et en particulier se lier à) une ou plusieurs molécules/cellules de la puce.

Et ces composants contiennent des marqueurs (typiquement des teintures ou molécules fluorescentes – que l'on nomme généralement « fluorophores ») qui permettent de détecter la présence des composants
30 après mise en contact de l'échantillon avec la puce. Cette détection

nécessite dans le cas de fluorophores l'excitation de la puce avec une lumière de longueur d'onde contrôlée

« **Molécule** » recouvre ici les molécules chimiques, et les
5 molécules biologiques.

Pour les applications biologiques, les « molécules biologiques » sont de préférence des acides nucléiques, de manière plus préférée des oligonucléotides simple brin.

Pour des applications chimiques, il peut s'agir de ligands chimiques
10 de molécules biologiques.

Par « acide nucléique, sonde nucléique, séquence nucléique ou séquence d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, séquences oligonucléotidiques », termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on
15 entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin, un PNA (pour « Peptid Nucleic Acid ») ou LNA (pour « Locked Nucleic Acid ») que des
20 produits de transcription desdits ADNs tels que l'ARN.

Par « **sonde, sonde oligonucléotidique ou oligonucléotide** », on entendra désigner ici l'oligonucléotide fonctionnalisé ou non qui sera déposé (ou « spotté ») et fixé par liaison covalente directement ou
25 indirectement au support solide via un composé espaceur au niveau d'un emplacement.

L'oligonucléotide ainsi déposé est capable de se lier à un acide nucléique cible de séquences complémentaires (c'est-à-dire un oligonucléotide ou polynucléotide complémentaire) présent dans
30 l'échantillon, par un ou plusieurs types de liaisons chimiques,

habituellement à travers un appariement de base complémentaire en formant des liaisons hydrogène.

De préférence, lesdites sondes sont des ADNs ou ARNs monobrins, de préférence des ADNs, dont la taille est comprise entre 10 et 7 000 bases (b), de préférence entre 10 et 1 000 b, entre 10 et 500 b, entre 10 et 250 b, entre 10 et 100 b, entre 10 et 50 b, ou entre 10 et 35 b.

Les sondes oligonucléotidiques déposées peuvent être synthétisées chimiquement, purifiées à partir de l'échantillon biologique ou plus généralement produites par les technologies de l'ADN recombinant à partir de polynucléotides naturels et/ou purifiés.

Des exemples, les sondes peuvent être produites par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), ou par RT-PCR (réaction de transcription inverse suivie d'une réaction PCR).

« **Emplacements ou spot** » correspond aux endroits de la puce au niveau duquel sont liées les molécules.

Une même molécule est de préférence présente en plusieurs copies au niveau d'un emplacement.

Les emplacements sont définis par leurs coordonnées en x et y par rapport à un point de référence sur la puce.

Un emplacement ou spot peut, par exemple, correspondre à une cercle de diamètre dépendant du volume d'une goutte de solution déposée dans une zone définie d'un plan, ou à un puit, ou encore à un pavé de dimension parallélépipédique de gel (appelé gel pad).

25

« **Echantillon** » correspond à une solution de molécules biologiques, biochimiques ou chimiques ou à un groupe cellulaire, dont on désire caractériser certaines propriétés.

Dans une application préférée de l'invention, l'échantillon est une solution contenant au moins un polynucléotide obtenu à partir d'une source biologique.

30

L'échantillon peut provenir d'une source vivante ou morte à partir de différents tissus ou cellules.

Des exemples d'échantillons biologiques comprennent les fluides biologiques, tels que le sang (notamment les leucocytes), l'urine, la salive, le sperme, les sécrétions vaginales, la peau, et également les cellules telles les cellules des follicules de la racine des cheveux, les cellules des tissus internes normaux ou pathologiques, en particulier provenant de tumeurs, les cellules des tissus de la villosité chorale, les cellules amniotiques, les cellules placentaires, les cellules fœtales, les cellules du cordon ombilical.

10

Par « **Marqueur** » ou « **marqueur générateur de signal** » on entend désigner un marqueur que l'on peut associer directement ou indirectement à une molécule biologique, biochimique ou chimique de l'échantillon, en vue de sa détection ultérieure par des moyens de lecture tels que ceux des lecteurs selon l'invention.

Le marqueur générateur de signal est de préférence sélectionné parmi les enzymes, les colorants, les haptènes, les ligands tels que la biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine ou les agents luminescents.

De préférence, le marqueur générateur de signal selon l'invention est un agent luminescent, qui selon la source d'énergie d'excitation, peut être classé en radio luminescent, chimiluminescent, bioluminescent et photo-luminescent (incluant fluorescent et phosphorescent).

De préférence, le marqueur générateur de signal selon l'invention est un agent fluorescent.

Le terme "**fluorescent**" se réfère en général à la propriété d'une substance telle un fluorophore de produire de la lumière lorsqu'elle est excitée par une source de lumière dans une longueur d'onde déterminée, appelée longueur d'onde d'excitation et d'émettre une lumière dans une longueur d'onde supérieure appelée longueur d'onde d'émission, qui

30

pourra être détectée à l'aide d'un capteur de photons, fournissant les signaux dont l'ensemble permettra de constituer une image des signaux d'hybridation de la puce.

Parmi les fluorophores mis en œuvre dans l'invention, on peut citer
5 de manière non exhaustive :

- l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) [longueur d'onde maximale d'absorption : 494 nm / longueur d'onde maximale d'émission : 517 nm] ;
- le Rouge Texas (TR pour Texas Red) [longueur d'onde maximale d'absorption : 593 nm / longueur d'onde maximale d'émission : 613 nm] ;
- 10 • la cyanine 3 (Cy3) [longueur d'onde maximale d'absorption : 554 nm / longueur d'onde maximale d'émission : 568 nm] ;
- la cyanine 5 (Cy5) [longueur d'onde maximale d'absorption : 652 nm / longueur d'onde maximale d'émission : 670 nm] ;
- la cyanine 5,5 (Cy5,5) [longueur d'onde maximale d'absorption : 675 nm /
15 longueur d'onde maximale d'émission : 694 nm] ;
- la cyanine 7 (Cy7) [longueur d'onde maximale d'absorption : 743 nm / longueur d'onde maximale d'émission : 767 nm] ;
- le Bopidy 630/650 [longueur d'onde maximale d'absorption : 632 nm / longueur d'onde maximale d'émission : 658 nm].
- 20 • L'Alexa 488 (495/519)
- L'Alexa 350 (347/422)
- La Rhodamine Red dye (570/590)

« **Réaction** » désigne une réaction chimique ou biologique
25 (hybridation par exemple) ayant lieu entre une molécule associée à un emplacement de la puce et une molécule de l'échantillon.

L'« **hybridation** » est une réaction qui se réfère à la liaison entre
une oligonucléotide déposé (ou « spotté ») et une séquence cible provenant
30 de l'échantillon biologique par appariement des bases complémentaires.

L'hybride ou duplex résultant de l'hybridation est appelé complexe d'hybridation ou duplex d'hybridation.

Un complexe d'hybridation peut être soit un complexe complémentaire ou un complexe avec mésappariement.

5 Ainsi, un complexe complémentaire est un complexe d'hybridation dans lequel il n'y a pas de mésappariement entre l'oligonucléotide déposé et entre la ou les séquences cible de l'échantillon.

Un complexe avec mésappariement est un complexe d'hybridation dans lequel il existe au moins un mésappariement entre l'oligonucléotide
10 déposé et entre la ou les séquences cible de l'échantillon.

Une hybridation spécifique se réfère à la liaison, à la formation de duplex, ou à l'hybridation d'une molécule d'acide nucléique, seulement sur une séquence nucléotidique particulière dans des conditions stringentes, et lorsque la séquence est présente dans un milieu complexe d'ADN ou
15 d'ARN.

Un « **oligonucléotide complémentaire** » est une sonde dont la séquence est parfaitement complémentaire à une séquence cible particulière (on utilisera dans ce texte le terme de « match » pour désigner ce type d'appariement parfait).
20

Une sonde présentant un mésappariement (« mismatch ») se réfère à une sonde ou des sondes dont la séquence n'est pas parfaitement complémentaire à une séquence particulière cible.

Bien que le mismatch puisse être localisé n'importe où dans la sonde
25 présentant les mésappariements, les mésappariements terminaux sont moins désirés car les mésappariements terminaux affecteront moins l'hybridation sur la séquence cible.

Ainsi, les sondes ont fréquemment un mésappariement situé au centre ou à côté du centre de la sonde, de telle sorte que le
30 mésappariement a davantage de chance de déstabiliser le duplex avec la séquence cible dans des conditions d'hybridation.

« **Duplex** » ou « **hybride** » correspond à un fragment d'ADN double brin. On verra que de tels duplexes sont obtenus par hybridation d'oligonucléotides (molécules disposées en des emplacements de la puce) avec les fragments simple brin d'un échantillon que l'on désire caractériser.

« **Lecture** » désigne de manière générale l'opération consistant à recueillir par un ou plusieurs capteurs adaptés la réponse des molécules après réaction, en vue de détecter un marqueur.

10 Cette lecture peut en particulier être une lecture optique, mais également en alternative une lecture par recueil d'un signal tel qu'un rayonnement radioactif.

On remarquera que dans ce texte la définition du « **lecteur** » de puces va au-delà de cette simple opération de lecture, puisqu'elle comprend également l'analyse des signaux « lus ».

Problèmes à résoudre et résumé de l'invention

20

Aspect « source de lumière »

On connaît déjà des lecteurs de puces du type mentionné ci-dessus.

25 De tels lecteurs permettent de recueillir, après réaction des molécules d'une puce avec les molécules d'un échantillon, la réponse desdites molécules à une excitation donnée.

Le recueil de cette réponse permet d'identifier des marqueurs réagissant spécifiquement à ladite excitation, qui peut être en particulier une illumination (excitation par une lumière) centrée sur une longueur d'onde déterminée.

30

La puce, de préférence de forme plane, est placée sur une table, qui peut être déplacée selon les trois axes longitudinal, transversal et vertical x, y, z de manière à successivement recevoir sur les différents emplacements (ou sous-ensembles de spots) de la puce le rayonnement d'excitation, et à présenter aux moyens d'observation ces différents emplacements.

La puce peut être placée directement sur la table ou encore dans une chambre de traitement (par exemple chambre d'hybridation) qui est elle-même fixée sur la table.

En alternative, la table peut être fixe (cas des moyens d'excitation et d'observation se déplaçant pour balayer les puits de la puce).

Ces lecteurs comprennent des moyens d'excitation qui se présentent généralement sous la forme d'une source de lumière (de l'ordre de quelques centaines de microns carrés à quelques millimètres carrés) permettant d'illuminer les molécules ou les cellules de la puce avec un spectre de longueur d'onde contrôlée, pour provoquer l'excitation d'un marqueur générateur de signal, de préférence fluorescent, que l'on recherche en association avec la molécule.

Ces moyens d'illumination se présentent généralement sous la forme d'une lampe (typiquement à xénon ou à mercure), ou d'une ou plusieurs diodes laser(s).

Les lampes à xénon fournissent un spectre continu et régulier, recouvrant les longueurs d'onde d'excitation de la plupart des marqueurs habituellement utilisés.

Cependant, une limitation de ces lampes est que le niveau d'énergie associé aux raies d'excitation des différents marqueurs peut être trop bas pour réaliser une excitation suffisante des raies désirées.

Les lampes à mercure fournissent, quant à elles, un spectre présentant des raies (maxima d'énergie) pour certaines longueurs d'onde.

De telles lampes permettent ainsi d'exciter suffisamment les marqueurs fluorescents excitables aux longueurs d'onde correspondant à ces raies.

5 Cependant, les raies d'excitation des lampes à mercure ne comprennent pas en particulier les longueurs d'onde permettant d'exciter le fluorophore (qui peut être du type Cy5, Cy7 ou un autre fluorophore ne pouvant être efficacement excités par une lampe à large spectre), couramment employé dans les applications de ces lecteurs. Ceci constitue une limitation importante des lampes à mercure.

10 En alternative aux lampes, il est connu de réaliser les moyens d'illumination du lecteur sous la forme d'un ou plusieurs laser(s) de longueur(s) d'onde donnée(s).

Les lasers « rouges » qui sont très courants et peu onéreux constituent ainsi une solution pratique et accessible pour exciter des 15 marqueurs tels que la cyanine5 ou la cyanine7. Mais dans le cas où l'on désire exciter des marqueurs réactifs à des longueurs d'onde situées dans les zones du bleu ou proches de l'ultra violet (par exemple pour exciter un marqueur du type FITC, il est nécessaire d'avoir recours à un laser de type moins courant, ce qui se traduit par un inconvénient important en terme de 20 prix.

Il apparaît ainsi que les solutions connues pour réaliser des moyens d'illumination des lecteurs comportent des limitations.

Un but de l'invention est de permettre de s'affranchir de ces limitations concernant les moyens d'illumination.

25

Aspect « contrôle de température »

Par ailleurs, pour de nombreuses applications, telles par exemple les réactions d'hybridation d'oligonucléotides ou les réactions enzymatiques

sur la puce, il serait avantageux de suivre avec le lecteur les paramètres de ces réactions en fonction de la température de la puce.

Il est ainsi connu de prévoir que la table du lecteur soit contrôlée en température. On trouvera un exemple d'un tel lecteur dans le document US
5 6 329 661.

Le fait d'ainsi associer à un lecteur de puces une table contrôlée en température peut permettre de commander la température de la table par l'envoi d'une consigne déterminée.

Un autre but de l'invention est de perfectionner cette disposition.

10 En particulier, un but de l'invention est de permettre la lecture de puces dans les conditions de température optimales pour l'observation des paramètres désirés, de manière automatique.

Afin d'atteindre les buts exposés ci-dessus, l'invention propose
15 selon un premier aspect un dispositif de lecture et analyse de puces, comprenant :

- Une table pour recevoir une puce destinée à caractériser au moins un échantillon,
- Des moyens d'excitation des molécules ou des cellules de la puce, après
20 réaction avec d'autres molécules,
- Des moyens de lecture et d'analyse des molécules soumises à excitation, caractérisé en ce que le dispositif comprend également :
 - une centrale de commande de température de ladite table, ladite centrale de commande étant reliée à un module (111) comportant
25 une pluralité d'éléments de chauffage / refroidissement de type Peltier disposés en regard de différents emplacements de la surface de la table,
 - et au moins un capteur de température de la table (112) également relié à ladite centrale de commande

30 Des aspects préférés, mais non limitatifs, de ce dispositif sont les suivants :

- la lampe est une lampe à mercure,
- le laser est un laser dont le rayonnement est centré sur une longueur d'onde de l'ordre de 635 nm,
- le lecteur comprend plusieurs lasers,
- 5 • les lasers sont centrés sur la même longueur d'onde,
- les moyens d'excitation comprennent au moins un laser associé à un module de balayage de son faisceau pour exciter les molécules à analyser,
- le lecteur comprend deux lasers et les modules de balayage des deux
- 10 lasers commandent deux balayages respectifs des molécules dans deux directions orthogonales,
- les moyens d'excitation comprennent au moins un ensemble de laser comprenant un laser dont le rayonnement est guidé par une fibre optique,
- 15 • les moyens d'excitation comprennent deux ensembles de laser identiques,
- les moyens d'excitation comprennent un laser fixe qui dirige son faisceau vers deux ensembles de miroir successifs montés en série et dont le déplacement est commandé le long de deux directions
- 20 différentes,
- le déplacement des deux ensembles de miroir sont commandés de manière à produire un faisceau qui peut emprunter toute séquence désirée sur la puce,
- les moyens d'excitation comprennent une lampe et un laser dont les
- 25 rayonnements empruntent un même chemin optique grâce à un miroir basculant apte à pivoter autour d'un axe entre deux positions pour diriger un de ces deux rayonnements vers la puce,
- une chaîne optique est interposée entre la lampe et les molécules à exciter, tandis que l'excitation par laser se fait par illumination directe
- 30 des molécules,

- ladite chaîne optique comprend des filtres de la lumière d'excitation à bande passante étroite ainsi que des filtres à bande passante étroite de la lumière en émission et un séparateur de faisceau
- le lecteur comprend également une centrale de commande d'excitation
5 reliée à chacun des moyens d'excitation pour la commande de leur fonctionnement,
- ladite centrale de commande d'excitation est apte à sélectivement commander l'illumination simultanée ou successive des molécules avec la lampe et au moins un laser, ou l'excitation séparée des molécules
10 avec la lampe et au moins un laser.

L'invention propose également un dispositif de lecture et d'analyse de puces, comprenant :

- Une table pour recevoir une puce destinée à caractériser au moins un
15 échantillon,
- Des moyens d'excitation des cellules ou molécules de la puce, après réaction avec d'autres molécules ou cellules,
- Des moyens de lecture des molécules ou cellules soumises à excitation, caractérisé en ce que le lecteur comprend également une centrale de
20 commande de la température.

Des aspects préférés, mais non limitatifs de ce dispositif sont les suivants :

- la table comprend un capteur de température relié à ladite centrale de commande de température.
- 25 • le lecteur comprend un module de chauffage/refroidissement associé à la table et destiné à contrôler sa température, ledit module de chauffage/refroidissement étant relié à la centrale de commande de température.
- le lecteur comprend également des moyens de traitement comprenant
30 un microprocesseur et reliés à la centrale de commande de température ainsi qu'aux moyens de lecture.

- le lecteur comprend des moyens de mémorisation de courbes de référence de la réponse des match et mismatch des molécules aux moyens d'excitation en fonction de la température.
- 5 • les moyens de mémorisation sont reliés à des moyens permettant de déterminer une température de fusion des match et mismatch des molécules à partir desdites courbes de référence.
- la centrale de commande de température est apte à commander le fonctionnement du lecteur selon un mode « statique » dans lequel des courbes de référence préétablies de la réponse des match et mismatch des molécules en fonction de la température sont utilisées pour établir une température de consigne apte à être transmise par ladite centrale de commande de température pour commander la température de ladite table.
- 10 • la centrale de commande de température est apte à commander le fonctionnement du lecteur selon un mode « dynamique » dans lequel la centrale de commande de température commande une évolution donnée de température au niveau de la table, et, pendant cette évolution de température :
 - les moyens de lecture recueillent en temps réel la réponse des molécules associées aux différents emplacements de la puce à l'excitation des moyens d'excitation, et transmettent ladite réponse à des moyens de traitement,
 - des moyens de mémorisation mémorisent pour chaque emplacement de la puce l'évolution de la réponse de la molécule en fonction de la température.
- 20 • le lecteur comprend des moyens de traitement aptes à établir pour chaque molécule, à l'issue de la mémorisation de ladite évolution de réponse, un diagnostic d'état de la molécule.
- ledit diagnostic d'état est un diagnostic de match/mismatch.

Et l'invention concerne également un procédé de mise en œuvre d'un tel dispositif, pour la lecture de puces.

Un tel procédé peut en particulier être un procédé d'hybridation des oligonucléotides d'une puce, pouvant être mis en œuvre par un lecteur
5 selon un des aspects ci-dessus, le procédé comprenant les étapes consistant à :

- Mettre en contact des sondes nucléiques correspondant à un acide nucléique cible avec un échantillon biologique contenant des fragments simple brin d'ADN, de manière à réaliser une hybridation
10 sélective de certaines sondes avec lesdits fragments simple brin d'ADN de l'échantillon, en constituant des duplexes,
- Effectuer une lecture des duplexes ainsi constitués, le procédé étant caractérisé en ce que le procédé comprend une étape de détermination automatique de :
15 ➤ la température de fusion de chaque acide nucléique cible dans une configuration de « match », et
➤ la température de fusion de chaque acide nucléique cible dans une configuration de « mismatch ».

Des aspects préférés, mais non limitatifs d'un tel procédé sont les
20 suivants :

- ladite détermination est réalisée en mode « statique » en utilisant des courbes de référence illustrant l'évolution, en fonction de la température, du signal reçu par des moyens de lecture de duplexes correspondant respectivement à des match et à des mismatch,
- 25 • le procédé comprend le contrôle de la température de manière à réaliser l'hybridation à une température correspondant à une discrimination maximale entre match et mismatch,
- le procédé comprend la constitution desdites courbes de référence lors d'une étape précédant l'étape de lecture,
- 30 • le procédé comprend la mémorisation desdites courbes de référence,

- ladite détermination peut être réalisée en mode « dynamique » par la commande d'une évolution donnée de température des échantillons, et, pendant cette évolution de température, on procède :
 - au recueil en temps réel de la réponse des duplexes associés aux différents emplacements de la puce à l'excitation des moyens d'excitation,
 - à la mémorisation pour chaque duplex de l'évolution de la réponse en fonction de la température,
- le procédé comprend pour chaque duplex l'établissement, à l'issue de la mémorisation de ladite évolution de réponse, d'un diagnostic de match/mismatch du duplex.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent à la lecture de la description suivante avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après :

- La figure 1 est un schéma de principe d'un lecteur selon l'invention.
- La figure 2 comprend :
 - Dans sa partie haute, un schéma de principe de la table d'un lecteur selon l'invention, détaillant les moyens de contrôle de température,
 - Dans sa partie basse, un graphe représentatif d'une évolution de température possible (et faisant notamment apparaître que des évolutions rapides de température – de l'ordre de 2,3 °C/s – sont possibles avec le dispositif selon l'invention),
- les figures 3a à 3d sont des schémas illustrant quatre variantes de réalisation de tout ou partie des moyens de lumière d'excitation d'un tel lecteur, la figure 3a comprenant en outre une illustration du balayage d'une puce par les sources de lumière des moyens d'excitation,
- Les figures 4a et 4b sont des graphes relatifs à une application de l'invention à l'hybridation moléculaire :
 - La figure 4a est une courbe de référence illustrant l'évolution en fonction de la température du signal en tous points d'une puce, reçu

par les moyens de lecture, pour une même séquence d'ADN en configuration d'appariement parfait (« match ») et en configuration de mésappariement (« mismatch »),

5 ➤ La figure 4b illustrant un mode dit « dynamique » de mise en œuvre de l'invention dans lequel on construit des courbes du type de celles de la figure 4a, pour plusieurs séquences d'ADN,

• La figure 5 est un schéma d'une réaction d'immobilisation de sondes sur lame présentant une fonction aldéhyde (lame Super Aldéhyde de
10 TéléChem). Des groupes aldéhyde sont attachés de manière covalente au support en verre de la biopuce (rectangle). La fonction NH₂ de la molécule d'ADN attaque la groupe aldéhyde pour former une liaison covalente (figure centrale). La liaison est stabilisée par une réaction de déshydratation (séchage dans une atmosphère faiblement humide) qui conduit à la formation d'une base de Schiff,

15 • La figure 6 illustre des images de la fluorescence Cy3 de l'hybridation d'un mélange d'oligonucléotides sauvage Q493X-Cy3 et muté Q493X-Cy5 sur une biopuce comprenant les sondes correspondantes déposées à différentes concentrations (50, 100 et 200 uM) puis immobilisées avec
20 différentes conditions (faible et forte humidité). L'hybridation est réalisée dans du SSC 6X, DSD 0,2% , BSA 0,2 mg/ml à température ambiante pendant 12 heures. La concentration des oligonucléotides est de 0,5 uM. Le lavage de la biopuce après l'hybridation est réalisée dans du SSC 6X, SDS 0,2% pendant 5 minutes à température ambiante suivi dans du SSC 2X pendant 2 minutes à température ambiante,

25 • la figure 7 montre des intensités de signaux de fluorescence et des ratios bruit/signal correspondent à l'hybridation d'une solution d'oligonucléotides wtQ493X-Cy3 et mutQ493X-Cy5 pour des puces comportant des sondes correspondant à différentes concentrations (50,
30 100 and 200 µM) et immobilisées sous différentes conditions (humidité basse et haute),

- la figure 8 représente des images de fluorescence correspondent à l'hybridation d'oligonucléotides ΔF -508 wild type marqués au Cy3, et d'oligonucléotides Q493X mutés marqués au Cy5.

5 **Description détaillée de l'invention**

En référence à la figure 1, on a représenté de manière schématique un lecteur 10 selon l'invention.

Le lecteur 10 comprend :

- 10 • Une table 11 pour recevoir une puce 12,
- Des moyens 13 d'excitation,
- Des moyens 14 de lecture (c'est à dire d'observation des molécules de la puce, en particulier en réponse à une excitation émise par les moyens 13),
- 15 • Des moyens de commande et de contrôle.

Table 11

La table 11 est détaillée dans la partie haute de la figure 2.

- 20 Cette table comporte de manière classique des moyens 110 pour tenir une puce 12.

Ces moyens peuvent comprendre une chambre – par exemple une chambre d'hybridation.

- 25 La table 11 est associée à un module 111 de chauffage/refroidissement apte à contrôler la température de la table.

Plus précisément, le module 111 comporte une pluralité d'éléments de chauffage / refroidissement par effet Peltier. Ces éléments Peltier sont intégrés dans l'épaisseur de la table 11.

- 30 Chacun de ces éléments Peltier est situé en regard d'un emplacement de la surface de la table 11 – et donc de la puce 12 qui est portée par la table.

Lesdits emplacements sont adjacents les uns aux autres, et leur réunion couvre la totalité de la surface de la puce.

Il peut être avantageux de prévoir que ces emplacements correspondent aux emplacements de la puce qui recevront les sondes (voir plus loin dans le texte).

Le module 111 est par ailleurs relié à une centrale de commande de température 15 qui élabore une consigne de température et la transmet au module 111 afin que celui-ci adapte la température de la table en conséquence, avec une vitesse de variation de température dépendant du phénomène physicochimique observé.

Plus précisément, la centrale de commande élabore une consigne individuelle de température à destination de chaque élément Peltier du module 111.

Ces éléments Peltier présentent des grandes qualités de précision – ils assurent typiquement une température de consigne avec une précision de l'ordre de 0,01 °C.

Le module 111 formé par la réunion de ces éléments Peltier est associé à un module d'échange de chaleur, pour permettre le chauffage / refroidissement de la table 11.

Ce module d'échange de chaleur peut fonctionner par circulation d'air, ou de fluide.

Il est ainsi possible de commander finement la température en tout emplacement de la table.

On peut en particulier de la sorte assurer que la température est strictement la même en tous les emplacements de la table 11.

Ceci est encore favorisé par le fait que les éléments Peltier sont très réactifs à des changements de consigne de température (à la hausse ou à la baisse).

Ces éléments peuvent donc assurer avec précision des changements de température rapides (typiquement, avec une précision de

l'ordre de 0,01 °C, et avec une vitesse de changement de quelques degrés par seconde).

Il est ainsi possible que l'on souhaite mettre en œuvre une évolution de température « rapide » - évolution de l'ordre de quelques
5 degrés par seconde, mise en œuvre par exemple dans des réactions de type PCR (acronyme de Polymerase Chain Reaction).

Il est également possible que l'on souhaite mettre en œuvre une évolution « lente » (évolution de l'ordre de quelques degrés par minute – mise en œuvre par exemple dans des réactions de type fusion de brins
10 d'ADN en vue de leur dissociation).

Pour pouvoir mettre en œuvre ces différents types d'évolutions, au moins une table de correspondance est mémorisée dans une mémoire du dispositif accessible par la centrale 15 (par exemple une mémoire de l'ordinateur 17 qui va être décrit).

15 On notera que la vitesse dépend non seulement du type de réaction envisagé, mais également du type de sonde utilisé, et de l'échantillon que l'on souhaite caractériser.

A cet égard, la ou les table(s) de correspondance prennent également en compte ces paramètres.

20 Et l'utilisateur du dispositif peut ainsi entrer dans une interface adaptée (clavier ou autre) et reliée à la centrale 15 et/ou à l'ordinateur 17 les paramètres (en particulier type de réaction, sonde, échantillon) en fonction desquels un, programme associé à la ou aux table(s) de correspondance sélectionnera automatiquement l'évolution de température
25 à transmettre en consigne au module 111.

Un capteur 112 de température est par ailleurs intégré dans la table, pour recueillir sa température effective et la transmettre à centrale de commande de température 15 à laquelle ce capteur est également relié.

De la sorte, la température des emplacements de la puce est
30 contrôlée par la centrale de commande de température 15, et cette

température des emplacements de la puce est en outre connue en temps réel par la centrale de commande de température.

Il est par ailleurs possible de prévoir plusieurs capteurs de température 112, en regard de groupes d'emplacements ou même de
5 chacun des emplacements individuels de la puce.

Le(s) capteur(s) 112 est (sont) intégré(s) dans la table 11.

Et comme on le verra plus en détail plus loin dans ce texte (notamment à propos du mode dynamique), ce(s) capteur(s) de température permet(tent) d'enregistrer les paramètres de température
10 associés au fonctionnement du dispositif, et également de réguler ce fonctionnement.

Moyens d'excitation 13

15 Les moyens d'excitation 13 comprennent deux types de sources de lumière :

- Une lampe 131 à spectre large – de préférence une lampe à mercure,
- Au moins un laser 132.

Ce laser émet selon une longueur d'onde qui permet d'exciter les
20 marqueurs habituellement utilisés, et dont le spectre d'excitation ne correspond pas au spectre d'émission de la lampe 131.

Dans le mode de réalisation préféré dans lequel la lampe est une lampe à mercure – qui ne permet pas d'exciter le marqueur Cy5 – le laser est un laser rouge classique émettant autour d'une raie centrée sur 635 nm
25 ou d'autres lasers permettant l'excitation de la molécule de Cy5.

De la sorte, l'ensemble des marqueurs luminescents habituellement utilisés peuvent être excités par les moyens d'excitation 13.

Et le recours à un laser n'augmente pas ici de manière significative le prix de revient du lecteur, ce type de laser étant extrêmement courant et
30 bon marché.

Les moyens d'excitation 13 comprennent également une source d'alimentation électrique respective 1310, 1320 pour chaque type de source de lumière.

Les moyens 13 comprennent en outre une chaîne optique 1311
5 interposée entre la lampe 131 et la table (donc entre la lampe et les molécules de la puce).

Comme représenté sur la figure 3a, cette chaîne optique comprend un filtre d'excitation 13111, et un séparateur de faisceau 13112 permettant de :

- 10 • Diriger vers la puce le rayonnement issu de la lampe et du filtre 13111,
- Et diriger vers les moyens de lecture 14 le signal issu de la puce en réponse à l'excitation reçue de la lampe (ou du ou des laser(s) des moyens d'excitation).

On précise que ladite chaîne optique peut également comprendre
15 des filtres de la lumière d'excitation à bande passante étroite ainsi que des filtres à bande passante étroite de la lumière en émission (au moins 2 et jusqu'à 8) et un séparateur de faisceau.

Les rayonnements dirigés vers la puce, et issus de cette puce, peuvent en outre traverser un objectif 134.

20 Les moyens d'excitation 13 comprennent également des moyens de changement de filtre interférentiel 1312 (représentés sur la figure 1), qui sont reliés au filtre 13111 et à des moyens 16 de contrôle de filtres.

On comprend donc que l'excitation des molécules de la puce par le rayonnement issu de la lampe se fait par l'intermédiaire d'une chaîne
25 optique.

L'excitation des molécules de la puce par le rayonnement issu du laser se fait quant à elle de manière directe, aucun élément n'étant interposé entre le laser et la puce.

Dans la variante qui est plus particulièrement illustrée sur la figure
30 3a, les moyens d'excitation comprennent deux lasers 1321 et 1322. Ces deux lasers sont identiques.

Chaque laser est associé à un module (non représenté) de balayage des de la biopuce.

Dans le cas où le lecteur ne comporte qu'un laser, ce laser est lui aussi associé à un module remplissant cette fonction, dans un faisceau de géométrie paramétrable .

Pour couvrir de manière efficace un champ de vue correspondant aux emplacements de la puce que l'on souhaite caractériser, et illuminer par laser ce champ de vue de manière homogène, les deux modules de balayage commandent deux balayages respectifs des molécules dans deux directions orthogonales.

Ce type de balayage est illustré dans la partie inférieure de la figure 3a.

Les deux bandes 13210 et 13220 représentent les faisceaux respectifs des deux lasers 1321 et 1322.

Ces deux faisceaux ont une section allongée, les directions d'allongement des deux faisceaux étant orthogonales.

Chacune de ces directions peut être alignée sur une des deux directions d'alignement des emplacements de la puce, ces emplacements formant généralement une matrice rectangulaire.

Chaque faisceau est déplacé par le module de balayage de son laser associé sur le champ de vue 120, selon une direction orthogonale à la direction d'allongement du faisceau.

La figure 3b représente une deuxième variante de réalisation des lasers des moyens d'excitation 13. Ces lasers sont destinés à être mis en œuvre à la place des lasers 1321 et 1322.

Dans cette variante, l'excitation des lasers est dirigée vers la puce 12 par deux ensembles identiques 1321' et 1322' qui produisent deux faisceaux respectifs 13210' et 13220'.

Un de ces ensembles, référencé 1321', est représenté en partie supérieure de la figure 3b.

Cet ensemble comprend un laser 13211' associé à une lentille de sortie 13212' qui dirige le flux issu du laser vers une fibre optique 13213'.

Cette fibre transmet elle-même le rayonnement jusqu'à une autre lentille, notée 13214', qui est montée fixe par rapport à la puce et dirige vers
5 elle le faisceau 13210'.

La partie basse de la figure 3a représente l'impact des deux faisceaux 13210' et 13220' sur la puce et le champ d'illumination 1320 ainsi défini.

Les lasers peuvent ainsi être déportés.

10 La figure 3c représente une troisième variante du système de laser(s) dans laquelle au moins un laser fixe 132" dirige son faisceau vers deux ensembles de miroir successifs montés en série, notés 1321" et 1322".

Chacun de ces ensembles de miroir comprend un miroir dont
15 l'orientation est commandée par un actuateur piezoélectrique respectif 13210", 13220".

Plus précisément, chaque miroir est ainsi déplacé selon un axe respectif, qui correspond à un des axes X, Y transversaux de la puce 12.

Le faisceau 1320" issu des deux miroirs est décrit ainsi sur la puce
20 un trajet 13201" qui peut emprunter toute séquence désirée en X, Y.

Ici encore, ce système de laser peut remplacer les lasers 1321, 1322 de la figure 3a.

La figure 3d illustre enfin une autre variante de réalisation des moyens d'excitation 13, qui correspond à une alternative aux moyens
25 représentés sur la figure 3a.

Cette figure 3d représente une lampe à mercure 131, et un laser 132.

Le laser et la lampe sont associés chacun à une lentille de sortie respective.

30 Dans cette variante, les rayonnements respectifs issus du laser et de la lampe empruntent le même chemin optique, grâce à un miroir

basculant 130 apte à pivoter autour d'un axe 1300 entre deux positions pour diriger un de ces deux rayonnements vers une série de lentilles 1301 et un miroir de renvoi 1302 permettant de diriger le rayonnement vers l'optique 134 et la puce 12.

- 5 Les moyens de commande de basculement du miroir 130 peuvent commander toute séquence permettant d'illuminer la puce avec les deux types de rayonnement (laser et lampe), par exemple en pivotant entre ses deux positions avec une fréquence désirée.

- 10 On précise que dans toutes les variantes présentées ci-dessus, les moyens d'excitation peuvent comprendre un laser, ou plusieurs lasers identiques.

Moyens de lecture 14

- 15 Les moyens de lecture 14 comprennent une chaîne optique 141 d'acquisition de l'image du champ 120 de la puce 12, cette puce pouvant par ailleurs être déplacée par rapport au reste du lecteur par un mouvement commandé de la table 11.

- 20 A cet effet, les moyens de lecture comprennent également des moyens de registre pour coordonner les déplacements de la table 11.

La chaîne optique 141 comprend ainsi une première optique d'acquisition 1411, et un filtre 1412 interposé entre cette première optique et une caméra CCD 142.

- 25 La chaîne optique 141 comprend également des moyens de changement de filtre 14120 (représentés sur la figure 1), qui sont reliés au filtre 1412 et aux moyens 16 de contrôle de filtres.

Moyens de contrôle et de commande

Les moyens de contrôle et de commande du lecteur comprennent, outre la centrale de commande de température 15 et les moyens 16 de contrôle de filtres déjà évoqués, un ordinateur 17 qui gère le fonctionnement de l'ensemble des composants du lecteur.

5 L'ordinateur est relié aux éléments suivants de manière à leur transmettre des instructions de fonctionnement et/ou à en recevoir des informations :

- sources d'alimentation 1310 et 1320 – l'ordinateur remplit à cet égard la fonction d'une centrale de commande d'excitation. On précise que
10 l'ordinateur peut sélectivement commander :
 - ✓ l'illumination simultanée des molécules de la puce avec la lampe et au moins un laser,
 - ✓ ou l'excitation séparée des molécules avec la lampe et au moins un laser,
- 15 ➤ centrale de commande de température 15 ,
- moyens 16 de contrôle de filtres,
- ainsi que les autres éléments de contrôle et de commande qui suivent.

Les moyens de contrôle et de commande du lecteur comprennent
20 ainsi également :

- un module 18 de commande de déplacement de la table 11, relié à cette table et à l'ordinateur 17,
- un module 19 de commande de la caméra 142, et d'acquisition des images de cette caméra, selon des modalités variables qui incluent le
25 mode temps réel pour le suivi d'un phénomène dynamique ou avec temps de pause pour l'augmentation du rapport signal-sur-bruit des images avec des spots (signaux d'hybridation) de très faible intensité.

On a ci-dessus décrit en détail la structure du lecteur selon l'invention. On a également abordé certains aspects de son fonctionnement, en particulier en ce qui concerne l'excitation des molécules de la puce. On va maintenant détailler le fonctionnement de ce lecteur, en ce qui concerne le contrôle de la température.

Plus précisément, on va décrire ce fonctionnement sur la base d'une application préférée de l'invention, qui est l'hybridation d'oligonucléotides d'une puce avec les fragments simple brin d'ADN issus d'un échantillon biologique.

On précise toutefois que le lecteur selon l'invention peut être mis en œuvre pour d'autres applications – par exemple pour réaliser des réactions enzymatiques (en particulier du type ligase, PCR, extension d'oligonucléotide simple, ...), de criblage de ligands.

Revenant à l'application d'hybridation, on étudie un échantillon biologique – par exemple issu d'un patient – pour y détecter certaines caractéristiques génétiques. La caractéristique recherchée peut par exemple être la présence éventuelle de mutations dans une séquence d'acide nucléique particulière, telle par exemple le gène CFTR.

Le procédé débute de manière classique avec la préparation d'une puce, en constituant aux différents emplacements de la puce des sondes nucléiques constituées à partir de nucléotides correspondant à un acide nucléique cible.

Ces sondes sont destinées à être hybridées avec l'échantillon contenant des fragments simple brin d'ADN.

Les fragments simple brin d'ADN sont obtenus par ailleurs, de manière connue, en particulier par amplification PCR. Ils sont associés à un marqueur de manière à permettre leur détection par les moyens de lecture du lecteur, après hybridation de ces fragments avec les sondes de la puce.

On met ensuite en contact lesdites sondes avec l'échantillon de manière à réaliser une hybridation sélective de certaines sondes avec

lesdits fragments simple brin d'ADN de l'échantillon, de manière à constituer des duplexes.

On précise que toutes les sondes ne s'hybrident pas avec les brins d'ADN de l'échantillon.

5 En effet, chaque sonde nucléique s'hybridera préférentiellement avec son acide nucléique cible.

Et certaines sondes correspondent ainsi à un acide nucléique sans mutation, alors que d'autres correspondent à un acide nucléique comprenant une mutation donnée.

10 Lors de cette étape d'hybridation se constituent des duplexes, pour les sondes qui sont effectivement hybridées.

Le fait qu'une sonde s'hybride correctement signifie que l'échantillon contient des fragments simple brin d'ADN correspondant à l'acide nucléique cible de ladite sonde.

15 Une sonde s'hybridant de la sorte correspond ainsi à un duplex de type « match » après l'étape d'hybridation.

Et une sonde ne s'hybridant pas – ou s'hybridant mal – avec les fragments simple brin d'ADN de l'échantillon correspond après l'étape d'hybridation à un duplex de type « mismatch » ou même à un simple brin
20 non hybridé.

La température est un paramètre important de cette étape d'hybridation.

En effet, pour chaque acide nucléique cible il existe :

- une température T_{m1} de fusion d'un duplex en configuration
25 « mismatch », et
- une température T_{m2} de fusion d'un duplex en configuration « match ».

La température de fusion correspond à la température à laquelle les deux brins de la moitié des duplexes se séparent.

T_{m1} est inférieure à T_{m2} , comme illustré sur la figure 4a.

Et il est désirable de réaliser, pour un acide nucléique cible donné, l'étape d'hybridation à une température correspondant à une discrimination maximale entre match et mismatch.

On peut en effet ainsi visualiser sélectivement les duplex « match »
5 et « mismatch », avec les moyens de lecture du lecteur de puce.

Cette température désirée est située entre T_{m1} et T_{m2} .

Dans le cas des procédés d'hybridation connus, il est généralement nécessaire de répéter plusieurs hybridations afin d'aboutir à une température proche de cette température désirée.

10 Dans le cas de l'invention, le contrôle de la température par l'intermédiaire de la centrale de commande de température 15 permet de s'affranchir de cet inconvénient.

Plus précisément, cette application de l'invention peut être mise en œuvre selon deux modes : un mode dit « statique » et un mode dit
15 « dynamique ».

Dans ces deux modes, on va déterminer automatiquement :

- la température de fusion de chaque acide nucléique cible dans une configuration de « match », et
- la température de fusion de chaque acide nucléique cible dans une
20 configuration de « mismatch ».

Mode statique

Ce mode est bien adapté au cas d'une puce dont les sondes
25 correspondent au même acide nucléique cible ou à des acides nucléiques cibles ayant des températures de fusion voisines.

Dans ce mode, ladite détermination de températures de fusion est réalisée au préalable, de sorte que ces températures sont connues avant d'effectuer la caractérisation.

30 Ces températures peuvent être connues de l'opérateur qui mène cette caractérisation et qui entre en conséquence une valeur de consigne

de température dans le dispositif (à l'aide d'une interface reliée à l'ordinateur 17, ou directement à la centrale 15).

Ces températures peuvent également être mémorisées dans une mémoire du lecteur qui est reliée à ladite centrale 15.

5 On contrôle ainsi la température de la puce de manière à réaliser l'hybridation à une température correspondant à une discrimination maximale entre match et mismatch.

On précise que les températures de fusion peuvent également être déterminées par le lecteur (voir mode dynamique ci-après), et mémorisées
10 pour la mise en œuvre du mode statique.

Lors d'une telle détermination a priori des températures de fusion on élabore des courbes de référence équivalentes à celles de la figure 4a.

Les courbes de référence peuvent ainsi être constituées lors d'une étape précédant l'étape de lecture.

15 Dans ce cas, le lecteur est mis en œuvre pour recueillir la réponse des sondes à des fragments simple brins de type connus (fragments correspondant à un acide nucléique cible sans mutation, et avec mutation), lorsque la température varie continûment sous l'effet de la commande de la centrale 15.

20 Et ces courbes peuvent être mémorisées, par exemple dans l'ordinateur 17.

Mode dynamique

25 Ce mode est particulièrement bien adapté au cas d'une puce dont les sondes correspondent à des acides nucléiques cibles dont les configurations « match » ont des températures de fusion très différentes.

Dans ce mode, on commande une évolution de température de la puce (par exemple augmentation constante ou diminution constante), de
30 manière à passer par les températures de fusion des différents acides nucléiques cibles des différentes sondes.

Cette évolution est obtenue par l'envoi d'une consigne adaptée de la centrale 15 aux éléments Peltier du module 111 associé à la table.

Pendant de cette évolution de température :

- les moyens de lecture 14 recueillent en temps réel la réponse des duplexes associés aux différents emplacements de la puce à l'excitation des moyens d'excitation 13, et transmettent ladite réponse à l'ordinateur 18,
- pour chaque emplacement de la puce, l'évolution de la réponse du duplex en fonction de la température est mémorisée dans une mémoire de l'ordinateur 18.

De plus, la présence d'au moins un capteur de température 112 dans la table permet :

- d'enregistrer tout au long de l'évolution les valeurs successives de température (et ce aux différents endroits de la table – et donc de la puce – où différents capteurs 112 sont disposés). Ceci permet de caractériser l'évolution de la réponse du duplex en fonction de la température,
- de contrôler la température sur la surface de la table. A cet égard, le(s) capteur(s) 112 permet(tent) une véritable régulation de température, au-delà d'une simple commande « aveugle » qui se contenterait de transmettre à un élément de chauffage une consigne de température.

On rappelle que les éléments Peltier étant très réactifs et permettant des changements de température rapides, des applications du type PCR sont en outre envisageables.

Et la combinaison d'éléments discrets de chauffage/refroidissement du type Peltier avec au moins un capteur de température permet ainsi :

- de contrôler finement la répartition de température en tous les emplacements de la table (et donc de la puce),
- et d'effectuer une véritable régulation allant au-delà d'une simple commande.

L'ordinateur construit ainsi pour chaque emplacement de la puce une courbe illustrant l'évolution de réponse de la sonde en fonction de la température, comme représenté sur la figure 4b qui illustre le cas très simple d'une puce à quatre emplacements (courbes 1, 2, 3 et 4).

5 Les sondes sont réparties par couples, une sonde du couple correspondant à un acide nucléique cible sans mutation, l'autre sonde correspondant au même acide nucléique cible avec une mutation.

La réponse des deux sondes de chaque couple va donc correspondre à deux courbes similaires aux deux courbes de référence de
10 la figure 4a.

Et il sera possible, par analyse des courbes de chaque couple de sondes, de déterminer la sonde « match » et la sonde « mismatch ».

L'ordinateur comprend à cet effet un programme apte à établir pour chaque emplacement de la puce, à l'issue de la mémorisation de ladite
15 évolution de réponse, un diagnostic d'état de la sonde associée à cet emplacement.

EXEMPLE DE MISE EN OEUVRE DE L'INVENTION

20

Le lecteur de puce selon l'invention permet de lire des puces à ADN. C'est donc également un objet de la présente invention de fournir une puce à ADN composée de nombreux oligonucléotides (ou sondes) correspondant ou comprenant des fragments de gène sauvage ou muté, notamment du
25 gène CFTR humain (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Une telle puce est particulièrement utile pour la détection de mutations du gène CFTR humain et le diagnostic de la mucoviscidose.

La mucoviscidose est l'une des maladies autosomiques récessives les plus fréquentes dans la population caucasienne puisqu'elle affecte
30 environ une personne sur 2000 naissance en Amérique du Nord (Boat et

al., The metabolic basis of inherited disease, 6th Ed. pp2649-1680, McGraw Hill, New York, 1989).

La mucoviscidose a été associée à des mutations dans le gène CFTR qui s'étend sur 250 kb et comprend 27 exons. Depuis la caractérisation du gène en 1989, de nombreuses analyses génétiques ont été menées pour définir le spectre des mutations de ce gène. Celles-ci sont d'une grande variété, et plus de 850 mutations ont ainsi été caractérisées. Cependant une mutation se retrouve à elle seule présente chez 50% des patients, il s'agit de la mutation Delta F508. La majorité des autres mutations est présente avec une faible incidence chez les patients (1-5 %).

Cette observation explique la complexité du développement des tests de diagnostic disponibles. Un test de diagnostic permet ainsi la détection d'environ 30 mutations distinctes en mettant en oeuvre des réactions de ligation en tube (OLA; Perkin Elmer).

D'autres approches impliquant les technologies des puces à ADN ont été développées pour l'identification des mutations du gène humain CFTR. Il convient ainsi de citer les brevets US 6,027,880, US 5,837,832, US 5,972,618, US 5,981,178). Néanmoins, à ce jour aucun test ne permet la détection des mutations les plus fréquentes du gène CFTR de manière simple, rapide, efficace et fiable. C'est le problème que se propose également de résoudre la présente invention en développant une puce à ADN pour la détection de mutations du gène CFTR humain susceptible d'être utiliser avec le lecteur selon l'invention.

25 Caractéristiques de la puce CFTR

La présente invention fournit donc un réseau d'oligonucléotides ou puce à ADN (puce CFTR), pour la détection de mutations du gène CFTR humain. Ce réseau comprend un support solide sur lequel une pluralité

d'oligonucléotides différents (les sondes) sont attachés de manière à ce que les dits oligonucléotides s'hybrident de manière efficace avec des oligonucléotides ou polynucléotides complémentaires (c'est-à-dire avec des oligonucléotides ou polynucléotides cibles présent dans l'échantillon biologique à tester, ou bien dériver de celui-ci), et de manière à ce que les dits oligonucléotides ayant des séquences de nucléotides différentes soient liés au dit support solide à des emplacements séparés de sorte que des oligonucléotides ayant une séquence nucléique spécifique s'hybrident de manière efficace avec des oligonucléotides ou des polynucléotides complémentaires cibles à une localisation particulière sur le dit support solide.

Ledit réseau se caractérise en ce qu'il comprend au moins une paire, au moins deux paires, au moins trois paires, au moins quatre paires, au moins cinq paires d'oligonucléotides, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 15 paires d'oligonucléotides, chaque paire d'oligonucléotides étant constituée par un oligonucléotide correspondant ou comprenant un fragment oligonucléotidique du gène CFTR sauvage (wt) et un oligonucléotide correspondant ou comprenant un fragment oligonucléotidique du gène CFTR muté (mut) et un oligonucléotide de contrôle négatif (cont) qui forme un duplex « mismatch » tant avec le gène CFTR muté que sauvage.

Deux ensembles de sondes de longueur environ 20 nt (en fonction de la composition de base) et de 15 nt sont constitués.

De préférence, ledit ensemble (sauvage/muté/contrôle) est sélectionné dans le groupe composé de :

ensemble N°1 : (cet ensemble n'a pas de sonde de contrôle)
TAGGAAACACCAAAGATGATATTT (SEQ ID N°1) 24 mer
CATAGGAAACACCAATGATATTTT (SEQ ID N°2) 24 mer

ensemble N°2 :

AGGAAACTGAGAACAGAATG (SEQ ID N°3) 21 mer

AGGAAACTAAGAACAGAATG (SEQ ID N°4) 21 mer

AGGAAACTTAGAACAGAATG (SEQ ID N° 5) 21 mer

5

ensemble N°3 :

ACCTTCTCCAAGAACTATATTG (SEQ ID N°6) / 22 mer

ACCTTCTCAAAGAACTATATTG (SEQ ID N°7) 22 mer

10 ACCTTCTCTAAGAACTATATTG (SEQ ID N° 8) 22 mer

ensemble N°4 :

TTCTTGCTCGTTGACCT (SEQ ID N° 9) / 17 mer

TTCTTGCTCATTGACCT (SEQ ID N°10) 17 mer

15 TTCTTGCTCCTTGACCT (SEQ ID N°11) 17 mer

ensemble N°5 :

TCGTTGACCTCCACTCA (SEQ ID N°12) / 17 mer

20 TCGTTGATCTCCACTCA (SEQ ID N°13) 17 mer

TCGTTGAACTCCACTCA (SEQ ID N°14) 17 mer

ensemble N°6

ACCTTCTCCAAGAAC (SEQ ID N°15) / 15 mer

25 ACCTTCTCAAAGAAC (SEQ ID N°16) 15mer

ACCTTCTCTAAGAAC (SEQ ID N° 17) 15mer

ensemble N°7 :

CTTGCTCGTTGACCT (SEQ ID N° 18) / 15 mer

30 CTTGCTCATTGACCT (SEQ ID N°19) 15 mer

CTTGCTCCTTGACCT (SEQ ID N°20) 15 mer

ensemble N°8 :

TCGTTGACCTCCACT (SEQ ID N°21) / 15 mer

TCGTTGATCTCCACT (SEQ ID N°22) 15 mer

5 TCGTTGAACTCCACT (SEQ ID N°23) 15 mer

10

La paire N°1 permet la détection de la mutation la plus fréquente du gène CFTR qui est la mutation delta F508 situé dans l'exon 10. Cette mutation correspond à une délétion de 3 paires de bases (codon AGA) qui résulte dans la délétion de l'acide aminé 508 de la protéine CFTR.

15 L'ensemble N°2 permet la détection de la mutation Q493X de l'exon 10 du gène CFTR. Cette mutation correspond à une substitution G -> A en position 493 qui résulte dans l'apparition d'une mutation non-sens.

Les ensembles N°3 et 6 permet la détection de la mutation G542X de l'exon 11 du gène CFTR. Cette mutation correspond à une substitution C
20 -> A en position 542 qui résulte dans l'apparition d'une mutation non-sens.

Les ensembles N°4 et 7 permet la détection de la mutation R553X de l'exon 11 du gène CFTR. Cette mutation correspond à une substitution G -> A en position 553 qui résulte dans l'apparition d'une mutation non-sens.

Les ensembles N°5 et 8 permet la détection de la mutation G551D
25 de l'exon 11 du gène CFTR. Cette mutation correspond à une substitution C -> T en position 551 qui résulte dans la substitution d'une glycine en position 551 par un acide aspartique.

De manière préférée, la présente puce CFTR comprend au moins l'ensemble des cinq paires d'oligonucléotides précédentes. La puce CFTR
30 selon l'invention se caractérise en ce que les oligonucléotides qui la compose, ont lorsqu'ils sont sous forme double brin, des températures de

fusion (T_m) similaires et de préférence comprises entre environ 55 et 85 °C, environ 65 et 75 °C, de préférence voisines de environ 70 °C (dans du 1 M NaCl). Ainsi, l'oligonucléotide de séquence :

De manière facultative, la puce CFTR selon l'invention comprend en
5 outre des oligonucléotides contrôle négatifs, c'est-à-dire des sondes formant des hybrides avec mésappariements avec toutes les cibles étudiées.

Le choix des séquences des oligonucléotides immobilisés sur la surface solide est d'une grande importance à l'obtention d'une bonne
10 distinction entre les hybrides avec mismatch et sans mismatch. Ainsi, un des paramètres importants réside dans la conception des sondes de manière à éviter la probabilité de formation de structures intramoléculaires secondaires ainsi que la probabilité de formation de complexes intermoléculaires par les sondes immobilisées, car ces structures diminuent
15 de façon importante l'efficacité d'hybridation de la cible sur la sonde, ainsi que la distinction entre les hybrides avec ou sans mismatch. Ainsi, les exigences relatives aux caractéristiques de l'oligonucléotides sont atteintes par le choix de la séquence nucléique de l'oligonucléotides, notamment de sa longueur et de sa composition en base, et/ou par l'adjonction de
20 nucléotides additionnels pour modifier le T_m ou la possibilité de formation de structures intramoléculaires et de complexes intermoléculaires. Ces exigences difficiles à satisfaire justifient l'activité inventive de la présente invention.

La puce CFTR selon l'invention revêtue de paires de sondes
25 oligonucléotidiques, est caractérisée en ce que lesdites sondes oligonucléotidiques sont déposées sous la forme d'emplacements ou de spots dont le diamètre moyen est compris entre 20 μm et 500 μm , de préférence entre 50 μm et 200 μm .

La distance moyenne entre le centre de chacun des emplacements
30 de sondes oligonucléotidiques est variable et dépend de la puce, mais ils sont définis de sorte à ne pas affecter les réactions d'hybridation sur deux

emplacements voisins. Néanmoins, de préférence cette distance est comprise entre 50 μm et 80 μm , entre 1 000 μm et 2 500 μm , ou entre 100 μm et 500 μm . Au niveau de chaque emplacement, de préférence de multiples copies d'un même oligonucléotide sont déposées. Ainsi, chaque
5 emplacement comprend de préférence au moins 1, au moins 2, ou de façon fréquente au moins 16, d'un même oligonucléotide.

Le nombre d'emplacements sur la puce selon l'invention est variable et dépend du nombre de paires d'oligonucléotides déposées sur la surface solide. De préférence, il s'agit d'un réseau moyenne densité, c'est-à-dire
10 avec un nombre d'emplacements restreints. Ainsi, le nombre desdits emplacements est d'au moins 2 par cm^2 , d'au moins 4 par cm^2 , d'au moins 6 par cm^2 , d'au moins 8 par cm^2 , d'au moins 10 par cm^2 , d'au moins 50 par cm^2 , d'au moins 100 par cm^2 , d'au moins 500 par cm^2 , d'au moins 1000 par cm^2 , d'au moins 10 000 par cm^2 , d'au moins 50 000 par cm^2 , d'au moins
15 100 000 par cm^2 .

Le support solide de la puce CFTR selon l'invention est choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon[®], en Kevlar[®], en silicone, en silicium ou en polyoses. De préférence, le support solide est une lame de verre, de manière plus préférée une lame de verre de
20 microscope.

De préférence il s'agit d'une lame fonctionnalisée avec un aldéhyde. A titre d'exemple de lame de verre 2D disponibles dans le commerce La puce selon l'invention est de préférence choisie parmi le type 2D micro-réseau ou 3D-micro-réseau. Selon un premier mode de réalisation il s'agit
25 de puce 2D dont les sondes sont fixées de préférence par une chimie amino- et aldéhyde selon les méthodes connues de l'homme de l'art. De l'ADN non modifié et de l'ADN amino-modifié peuvent ainsi respectivement hybridés sur ces substrats par liaison covalente.

On peut citer les lames de type substrat SuperAldehyde pour
30 l'immobilisation d'ADN amino-modifiée ou de type substrat SuperAmine pour

l'immobilisation d'ADN non modifié, (par exemple les lames TeleChem Array It – marque déposée).

Le principe général de l'immobilisation de l'ADN amino-modifié sur lame fonctionnalisée avec un aldéhyde du commerce est illustré sur la
5 figure 5

Les figures 6 et 7 illustrent l'effet de modification du protocole, de manière à réaliser un couplage de l'AND avec une surface de SuperAldehyde sous haute humidité (humidité dans une boîte de plastique fermée d'un volume d'environ 700 cm³ remplie par un demi-volume d'eau).

10 Cette modification permet une augmentation de l'efficacité d'immobilisation et du ratio signal/bruit.

Selon un second mode de réalisation il s'agit de puce 3D à base d'hydrogel, telles que les 3D-link activated slides™ (Motorola) qui présentent l'avantage (i) d'une plus grande efficacité d'immobilisation des
15 sondes, et ainsi une meilleure intensité du signal d'hybridation ; (ii) d'une meilleure distinction entre les hybrides avec ou sans mismatches (Livshits et Mirzabekov, 1996, Theoretical analysis of the kinetics of DNA hybridization with gel-immobilized oligonucleotides. Biophys. J. Nov. ; 71(5) 2795-2801).

20 De préférence les oligonucléotides de la puce CFTR décrits ci-dessus sont déposés et liés à la surface solide sous la forme d'ADN monobrin par l'une des extrémités de l'oligonucléotides. De préférence il s'agit de l'extrémité 3'.

25 ***Mise en oeuvre de la puce CFTR***

Procédure

Matériels et méthodes : conditions d'hybridation

Hybridation d'olégonucléotides et puce

30 Un échantillon réalisé à partir d'un mélange de :

- oligonucléotides non mutés (« wild type » ou « wt »), marqués avec un fluorophore Cy3, et
- oligonucléotides mutés (« mutated » ou « mut »), marqués avec un fluorophore Cy5

5 a été hybridé sur une puce :

AAATATCATCTTTGGTGTTTCCTA-Cy3 (Δ F508-wt)

AAAATATCATTGGTGTTTCCTATG-Cy5 (Δ F508-mut)

CATTCTGTTCTCAGTTTTCT-Cy3 (Q493X-wt)

10 CATTCTGTTCTTAGTTTTCT-Cy5 (Q493X-mut)

AATATACTTGGAGAAGGT-Cy3 (G542X -wt)

ACCTTCTCAAAGTATATT-Cy5 (G542X-mut)

15 AGGTCAACGAGCAAGAA-Cy3 (R552X -wt)

AGGTCAATGAGCAAGAA-Cy5 (R552X -mut)

TGAGTGGAGGTCAACGA-Cy3 (G551D-wt)

20

TGAGTGGAGATCAACGA-Cy5 (G551D-mut)

La figure 8 montre les images d'hybridation correspondant à l'hybridation des oligonucléotides Δ F508-wt, Δ F508-mut, Q493-wt et Q493X-mut sur la puce.

25

On observe une discrimination match/mismatch pour toutes les mutations.

Matériels et méthodes : conditions d'hybridation

les oligonucléotides marqués à l'extrémité 3' de la firme Metabion ont été utilisés. La qualité des oligonucléotides a été vérifiée dans un gel à 20% de polyacrylamide, dans des conditions de dénaturation.

L'hybridation des oligonucléotides marqués par fluorophore sur la puce a été réalisée dans une solution de type 2xSSC, 0.2% SDS, 0.2 mg/ml BSA à température ambiante, pendant 12 heures. Le volume de la chambre d'hybridation était de 180 μ l, la concentration de chaque oligonucléotide était 0.1 μ M.

Le lavage post hybridation de la puce a été ensuite réalisé dans une solution 2xSSC, 0.2% SDS pendant une minute à température ambiante.

La puce a ensuite été séchée par centrifugation pendant une minute à 500 x g en accord avec le protocole TeleChem, puis lue.

De manière générale, cette application de l'invention comprend l'utilisation d'une puce CFTR selon l'invention pour la détection de la présence éventuelle de mutation dans la séquence du gène CFTR d'un patient, de préférence en mettant en oeuvre le lecteur selon l'invention.

Les étapes essentielles de ce procédé sont les suivantes :

- Préparation de l'oligonucléotide ou du polynucléotides cibles :

L'ADN génomique, ou les ARN messagers, ou leurs fragments, sont extraits de l'échantillon biologique selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier. En utilisant les technologies de l'ADN recombinant, les ARN sont éventuellement transformés en ADNc (ADN complémentaires).

L'ADN ainsi isolé est ensuite fragmenté et ou soumis à une amplification par PCR pour générer des fragments oligonucléotidiques. Ceux-ci sont marqués, avant, simultanément ou après avec des marqueurs générateur de signal selon les méthodes conventionnelles. Selon un mode préféré de réalisation, l'ADN ainsi isolé est amplifié par PCR à l'aide d'amorce spécifique de la région du gène CFTR testé en utilisant des nucléotides

marqués ou modifiés. Les ADNs, ADNc, ou ARNs ainsi marqués sont ensuite dénaturés pour obtenir des molécules simple brin.

- Marquage fluorescent du produit *ssPCR*

5 *Un produit ssPCR* exon 10 (longueur d'environ 400 nt) a été marqué 3'-end avec des marqueurs fluorescents Cy3 ou Cy5, comme suit :

- 100 pmol de produit *ssPCR* été dissous dans 25 µl d'une solution : (1x TdT tampon, 400 pmol de Cy3-UTP (ou Cy5-UTP) dans de l'eau),
- 10 unités de TdT ont été ajoutées.

10 La réaction a été réalisée à 37 °C pendant 1 heure. Les marqueurs non liés ont été supprimés avec des colonnes de QIAGEN® DyeEx™ Spin Kit selon le protocole de QIAGEN .

- Hybridation des ADN cibles avec les oligonucléotides de la
15 puce :

Les ADNs, ADNc, ou ARNs ainsi marqués et dénaturés sont ensuite déposés sur la puce et, le cas échéant, se lient par hybridation spécifique dans des conditions d'hybridation de stringence définie avec les sondes oligonucléotidiques. Après un lavage pour éliminer l'excès d'ADNs, ADNc,
20 ou ARNs marqués et/ou hybridés de manière non spécifique, les duplexes formés sont détectés en mettant en oeuvre le lecteur selon l'invention.

L'analyse des mutations du gène CFTR peut se faire selon une première méthode qui consiste à comparer les intensités des signaux d'hybridation des oligonucléotides cibles sauvage (wt) et/ou muté sur la
25 bipuce CFTR, en utilisant une seul type d'oligonucléotide cible marqué avec un fluorophore. Une seconde approche utilise l'hybridation sur la puce CFTR d'au moins deux oligonucléotides cibles différents marqués avec des marqueurs générateur de signal distincts, l'un des oligonucléotides
provenant de l'échantillon à tester, l'autre correspondant à un
30 oligonucléotide de référence (en général, l'oligonucléotide correspondant à la séquence sauvage).

hybridation

L'hybridation de sondes sur les dits oligonucléotides cibles est
5 réalisée à une température d'environ 20°C dans le tampon d'hybridation
défini ci-après et ne comprenant pas de formamide. L'homme du métier
devra adapter ces conditions d'hybridations si le milieu d'hybridation utilisé
contient de la formamide.

De manière préférée, le milieu d'hybridation de la dite puce CFTR
10 selon l'invention comprend au moins du SSC 6X (1 x SSC correspond à une
solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), du sodium dodécyl
sulfate 0,2 %, et optionnellement 0,2 mg/ml de sérum albumine bovine.
L'homme du métier pourra éventuellement modifier ces conditions avec des
composés ayant une fonction analogue dans le tampon d'hybridation. Ainsi,
15 il pourrait être envisager de remplacer la sérum albumine bovine par de la
gélatine ou le tampon SSC par du tampon SSPE (5X SSPE se compose de
750 M NaCl, 50 mM Na phosphate, 5 mM EDTA, pH 7,4).

Par conditions permettant l'hybridation spécifique d'acides nucléiques
cibles avec lesdites sondes oligonucléotidiques, il s'agit de préférence de
20 conditions de forte stringence notamment telles que définies ci-après. Les
conditions « stringentes » sont des conditions dans lesquelles une sonde va
hybrider sur sa séquence cible, mais pas sur les autres séquences. Les
conditions de stringences sont dépendantes de la séquence, et sont
différentes en fonction des circonstances. Une variété de facteur peut
25 influencer la stringence d'hybridation. Parmi ceux-ci, il convient de citer la
composition en base, la taille des brins complémentaires, la présence de
solvants organiques et la longueur des mésappariements de bases. Pour
une discussion sur les facteurs généraux qui influencent l'hybridation, on
peut se référer par exemple au WO 93/02216 ou Ausubel *et al.* (Current
30 Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, Inc and John
Willey and Sons, Inc). En général, les conditions de stringence sont

sélectionnées de sorte que la température est de 5°C inférieure à la température du point de fusion (melting point, T_m), pour une séquence spécifique à une force ionique et un pH défini. Le T_m est la température (sous des conditions de force ionique, de pH, et de concentration en acide nucléique définies) à laquelle 50% des sondes complémentaires à une séquence cible s'hybrident à la séquence cible à l'équilibre. De manière classique, des conditions de stringence incluent une concentration en sel d'au moins environ 0,01M jusqu'à 1M de concentration de sodium ou d'autres sels, à un pH de 7,0 jusqu'à 8,3 et une température d'au moins environ 30°C pour les petites sondes (10 à 50 nucléotides). Des conditions de stringence peuvent également être obtenues avec l'addition d'agents déstabilisants tels que la formamide ou les sels de tétra-alkyl-ammonium. Par exemple, les conditions de stringence de 5X SSPE (750 M NaCl, 50 mM Na phosphate, 5 mM EDTA, pH 7,4) et une température de 25°-30°C sont des conditions habituellement utilisées pour l'hybridation de sondes spécifiques d'allèles.

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN ou d'ARN/ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les conditions d'hybridations décrites ci-dessus, sont avantageusement les suivantes : l'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC, 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1

% SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook *et al.* (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

Enfin, l'hybridation peut être réalisée dans un atmosphère plus ou moins humide. Des conditions d'hybridation en faible humidité ou en forte humidité pourront permettre d'optimiser la spécificité d'hybridation.

La stringence peut être déterminée de manière empirique en augmentant de manière graduelle les conditions de la stringence, par exemple en augmentant la concentration en sel, ou en augmentant la température jusqu'à ce que l'on obtienne le niveau désiré de spécificités. La présente invention permet ainsi d'augmenter les conditions de stringence en contrôlant avec précision une augmentation de la température.

L'invention fournit également un kit de diagnostic de la mucoviscidose comprenant un réseau d'oligonucléotides ou puce CFTR selon l'invention. Le kit ou nécessaire pour la détection de mutations ou le génotypage du gène CFTR humain dans un échantillon, est caractérisé en ce qu'il comprend une puce CFTR selon l'invention et optionnellement les réactifs nécessaires au marquage des oligonucléotides ou polynucléotides cibles. C'est donc également un objet de la présente invention d'utiliser le réseau d'oligonucléotides selon l'invention, ou puce CFTR pour le diagnostic de la mucoviscidose chez un individu.

La présente invention a également pour objet un procédé pour la détection de mutations du gène CFTR à partir d'un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) le dépôt de l'échantillon contenant des oligonucléotides ou des polynucléotides cibles, dérivés du gène CFTR humain dans lequel on cherche à détecter la présence éventuelle de mutations, sur une puce revêtue de sondes oligonucléotidiques selon l'invention, dans des conditions

permettant l'hybridation spécifique de ces oligonucléotides ou des polynucléotides cibles avec lesdites sondes oligonucléotidiques;

b) le cas échéant, le rinçage de la puce obtenue à l'étape a) dans les conditions appropriées afin d'éliminer les acides nucléiques de l'échantillon
5 non capturés par hybridation ; et

c) la détection, facultativement à l'aide du lecteur selon l'invention, des acides nucléiques capturés sur la puce par hybridation.

C'est également un des objets de la présente invention de fournir un procédé *in vitro* de diagnostic de la mucoviscidose chez un individu
10 comprenant les étapes suivantes:

(a) obtention d'au moins un fragment d'ADN dérivé du gène CFTR d'un individu;

(b) marquage dudit fragment avec un marqueur générateur de signal; optionnellement dénaturation dudit fragment pour obtenir un fragment
15 simple brin.

(c) hybridation du dit fragment marqué avec un réseau d'oligonucléotides selon l'invention.

(d) détection du fragment d'ADN s'hybridant spécifiquement avec un ou plusieurs oligonucléotides du dit réseau ;

(e) optionnellement détermination de la présence d'une muatation du
20 gène CFTR chez le dit individu.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, les dits fragments sont marqués à l'étape (b) directement ou indirectement par un marqueur générateur de signal selon l'invention ; de préférence il s'agit d'un
25 marqueur fluorescent choisi dans le groupe composé de de Cy3, Cy5, FITC, TexasRed (Rhodamine) ,Bodipy630/650, l'Alexa 488, Alexa 350...

Selon un premier mode de réalisation, une acide nucléique cible unique marqué avec un marqueur générateur de signal est hybridé sur la dite puce CFTR.

30 Selon un second mode de réalisation, au moins un, au moins 2, au moins 3, au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au

moins 9, au moins 10 acides nucléiques cibles marqués avec un marqueur générateur de signal est/ont hybridé(s) sur la dite puce CFTR..

Le lecteur selon l'invention permet en effet de détecter simultanément ou de manière décalé dans le temps des hybrides ou
5 duplexes marqués avec des marqueurs différents.

REVENDICATIONS

- 5 1. Dispositif de lecture et analyse de puces, comprenant :
- Une table pour recevoir une puce destinée à caractériser au moins un échantillon,
 - Des moyens d'excitation des molécules ou des cellules de la puce, après réaction avec d'autres molécules,
 - 10 • Des moyens de lecture et d'analyse des molécules soumises à excitation,
- caractérisé en ce que le dispositif comprend également :
- une centrale de commande de température de ladite table, ladite centrale de commande étant reliée à un module (111) comportant une pluralité d'éléments de chauffage / refroidissement de type Peltier disposés en regard de différents emplacements de la surface de la table,
 - 15 • et au moins un capteur de température de la table (112) également relié à ladite centrale de commande.
- 20
2. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que les moyens d'excitation comprennent une lampe à spectre large et au moins un laser.
- 25 3. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le laser est un laser dont le rayonnement est centré sur une longueur d'onde de l'ordre de 635 nm.
4. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce
- 30 que le lecteur comprend plusieurs lasers.

5. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que les lasers sont centrés sur la même longueur d'onde.
- 5 6. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens d'excitation comprennent au moins un laser associé à un module de balayage de son faisceau pour exciter les molécules à analyser.
- 10 7. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le lecteur comprend deux lasers et les modules de balayage des deux lasers commandent deux balayages respectifs des molécules dans deux directions orthogonales.
- 15 8. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les moyens d'excitation comprennent au moins un ensemble de laser comprenant un laser dont le rayonnement est guidé par une fibre optique.
- 20 9. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que les moyens d'excitation comprennent deux ensembles de laser identiques.
- 25 10. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les moyens d'excitation comprennent un laser fixe (132") qui dirige son faisceau vers deux ensembles de miroir successifs montés en série et dont le déplacement est commandé le long de deux directions différentes.
- 30 11. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le déplacement des deux ensembles de miroir sont commandés de manière à produire un faisceau qui peut emprunter toute séquence désirée sur la puce.

12. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les moyens d'excitation comprennent une lampe et un laser dont les rayonnements empruntent un même chemin optique grâce à un miroir basculant (130) apte à pivoter autour d'un axe (1300) entre deux positions pour diriger un de ces deux rayonnements vers la puce.
13. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que une chaîne optique est interposée entre la lampe et les molécules à exciter, tandis que l'excitation par laser se fait par illumination directe des molécules.
14. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ladite chaîne optique comprend des filtres de la lumière d'excitation à bande passante étroite ainsi que des filtres à bande passante étroite de la lumière en émission et un séparateur de faisceau.
15. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le lecteur comprend également une centrale de commande d'excitation reliée à chacun des moyens d'excitation pour la commande de leur fonctionnement.
16. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ladite centrale de commande d'excitation est apte à sélectivement commander l'illumination simultanée ou successive des molécules avec la lampe et au moins un laser, ou l'excitation séparée des molécules avec la lampe et au moins un laser.
17. Dispositif de lecture et d'analyse de puces, comprenant :
- Une table pour recevoir une puce destinée à caractériser au moins un échantillon,

- Des moyens d'excitation des cellules ou molécules de la puce, après réaction avec d'autres molécules ou cellules,
 - Des moyens de lecture des molécules ou cellules soumises à excitation,
- 5 caractérisé en ce que le lecteur comprend également une centrale de commande de la température.

18. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la table comprend un capteur de température relié à ladite centrale de commande de température.

10

19. Dispositif selon l'une des deux revendications précédentes, caractérisé en ce que le lecteur comprend un module de chauffage/refroidissement associé à la table et destiné à contrôler sa température, ledit module de chauffage/refroidissement étant relié à la centrale de commande de température.

15

20. Dispositif selon l'une des trois revendications précédentes, caractérisé en ce que le lecteur comprend également des moyens de traitement comprenant un microprocesseur et reliés à la centrale de commande de température ainsi qu'aux moyens de lecture.

20

21. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le lecteur comprend des moyens de mémorisation de courbes de référence de la réponse des match et mismatch des molécules aux moyens d'excitation en fonction de la température.

25

22. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que les moyens de mémorisation sont reliés à des moyens permettant de déterminer une température de fusion des match et mismatch des molécules à partir desdites courbes de référence.

30

23. Dispositif selon l'une des six revendications précédentes, caractérisé en ce que la centrale de commande de température est apte à commander le fonctionnement du lecteur selon un mode « statique » dans lequel des courbes de référence préétablies de la réponse des match et mismatch des molécules en fonction de la température sont utilisées pour établir une température de consigne apte à être transmise par ladite centrale de commande de température pour commander la température de ladite table.
24. Dispositif selon l'une des sept revendications précédentes, caractérisé en ce que la centrale de commande de température est apte à commander le fonctionnement du lecteur selon un mode « dynamique » dans lequel la centrale de commande de température commande une évolution donnée de température au niveau de la table, et, pendant cette évolution de température :
- les moyens de lecture recueillent en temps réel la réponse des molécules associées aux différents emplacements de la puce à l'excitation des moyens d'excitation, et transmettent ladite réponse à des moyens de traitement (18),
 - des moyens de mémorisation mémorisent pour chaque emplacement de la puce l'évolution de la réponse de la molécule en fonction de la température.
25. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le lecteur comprend des moyens de traitement aptes à établir pour chaque molécule, à l'issue de la mémorisation de ladite évolution de réponse, un diagnostic d'état de la molécule.
26. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ledit diagnostic d'état est un diagnostic de match/mismatch.

27. Procédé d'hybridation des oligonucléotides d'une puce, pouvant être mis en œuvre par un lecteur selon une des revendications précédentes, le procédé comprenant les étapes consistant à :
- 5 • Mettre en contact des sondes nucléiques correspondant à un acide nucléique cible avec un échantillon biologique contenant des fragments simple brin d'ADN, de manière à réaliser une hybridation sélective de certaines sondes avec lesdits fragments simple brin d'ADN de l'échantillon, en constituant des duplexes,
 - 10 • Effectuer une lecture des duplexes ainsi constitués, caractérisé en ce que le procédé comprend une étape de détermination automatique de :
 - la température de fusion de chaque acide nucléique cible dans une configuration de « match », et
 - 15 • la température de fusion de chaque acide nucléique cible dans une configuration de « mismatch ».
28. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que ladite détermination est réalisée en mode « statique » en utilisant des courbes
- 20 de référence illustrant l'évolution, en fonction de la température, du signal reçu par des moyens de lecture de duplexes correspondant respectivement à des match et à des mismatch.
29. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le
- 25 procédé comprend le contrôle de la température de manière à réaliser l'hybridation à une température correspondant à une discrimination maximale entre match et mismatch.
30. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le
- 30 procédé comprend la constitution desdites courbes de référence lors d'une étape précédant l'étape de lecture.

31. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le procédé comprend la mémorisation desdites courbes de référence.
- 5 32. Procédé selon l'une des cinq revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite détermination peut être réalisée en mode « dynamique » par la commande d'une évolution donnée de température des échantillons, et, pendant cette évolution de température, on procède :
- 10 • au recueil en temps réel de la réponse des duplexes associés aux différents emplacements de la puce à l'excitation des moyens d'excitation,
- à la mémorisation pour chaque duplex de l'évolution de la réponse en fonction de la température.
- 15 33. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le procédé comprend pour chaque duplex l'établissement, à l'issue de la mémorisation de ladite évolution de réponse, d'un diagnostic de match/mismatch du duplex.

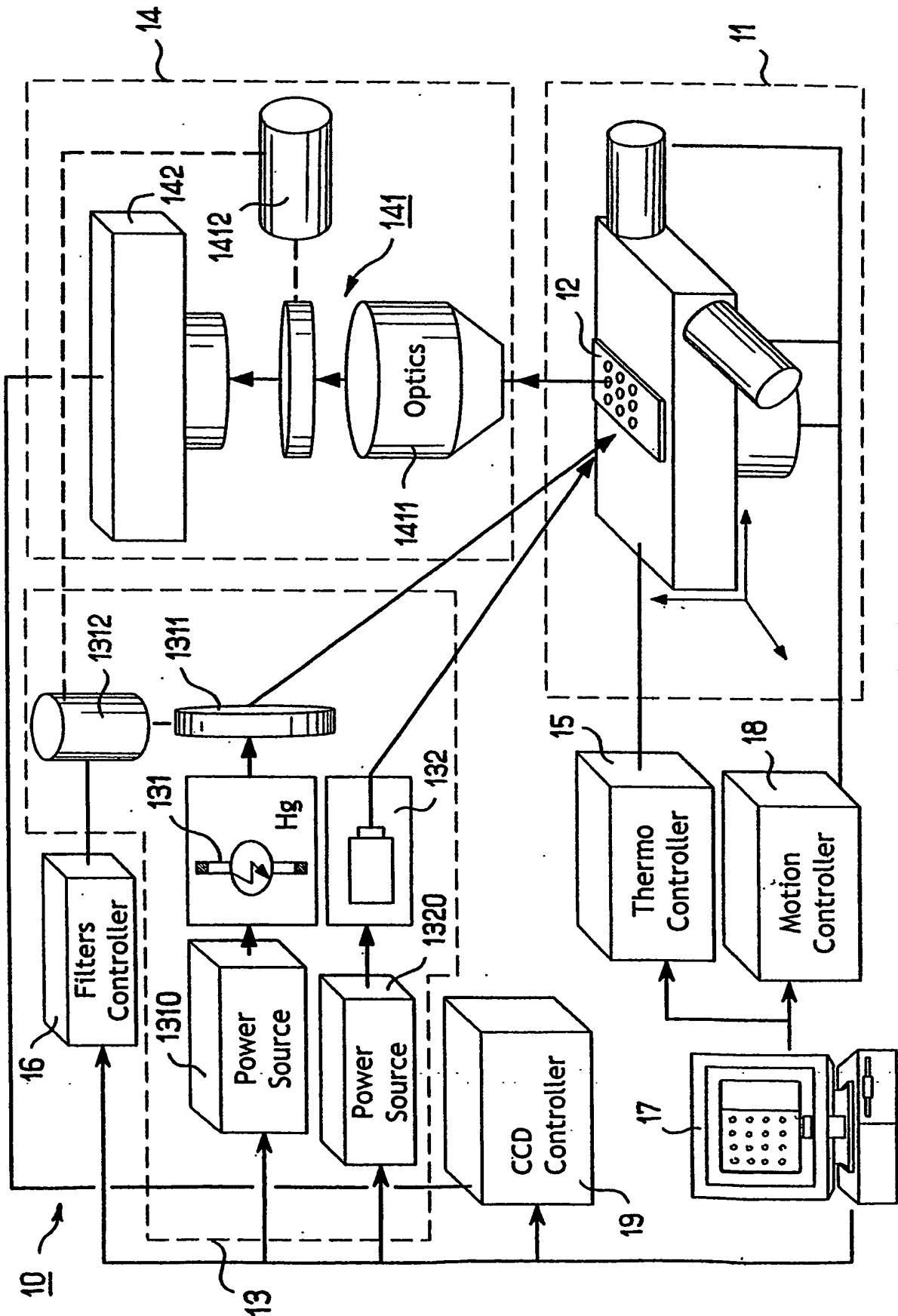


FIG.1

2/11

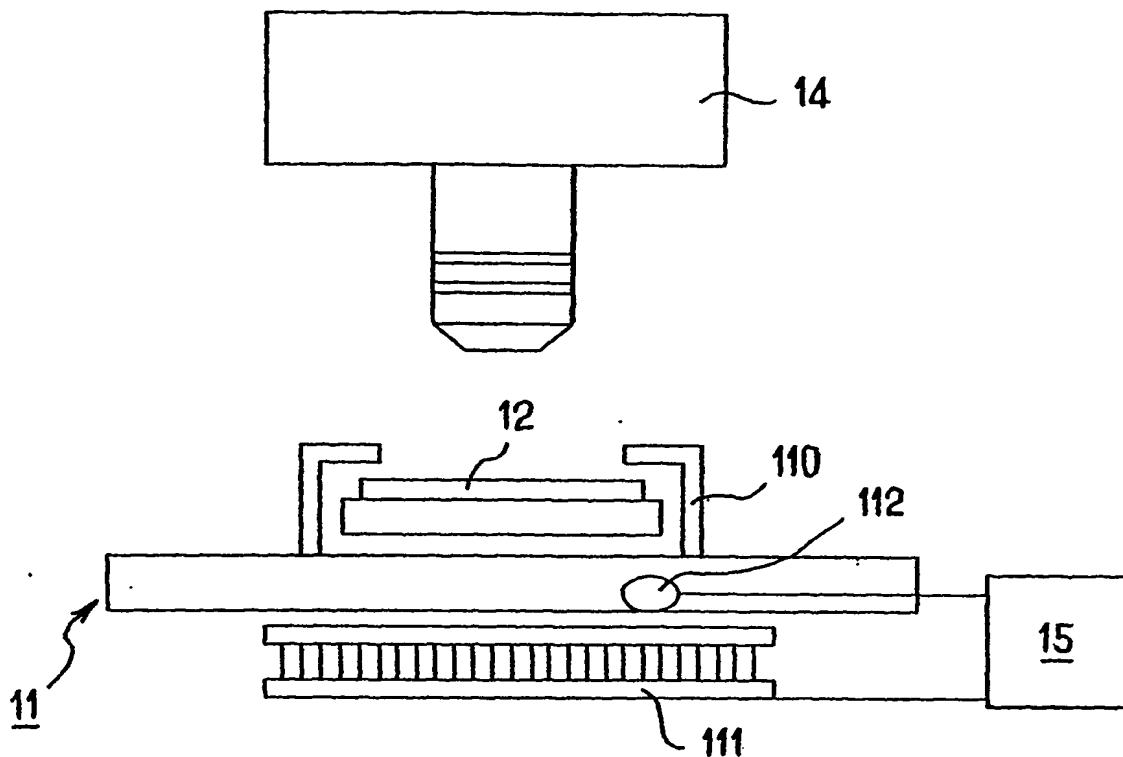
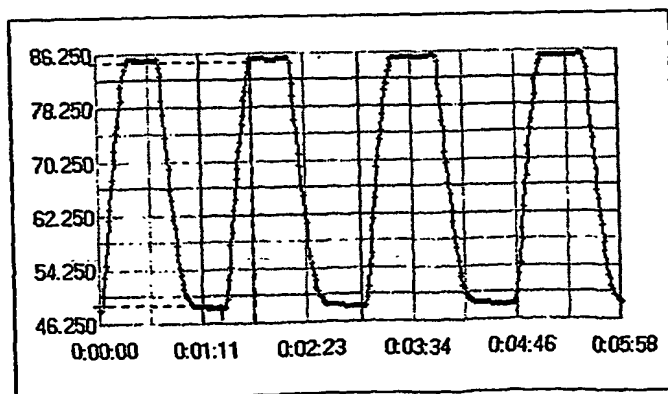


FIG.2



Chauffage 2.3 °C/s
Refroidissement 2.3 °C/s

3 / 11

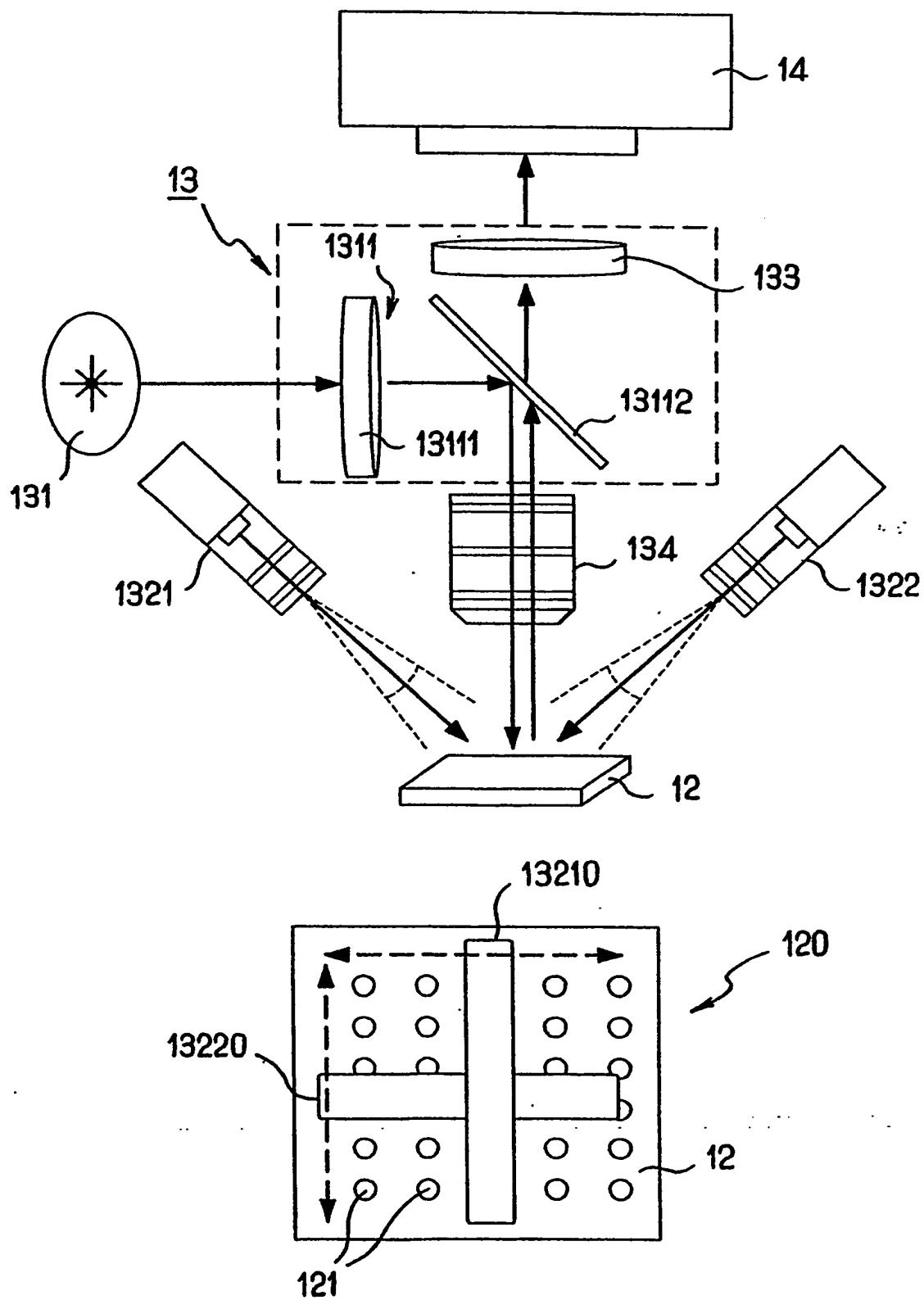


FIG.3a

4 / 11

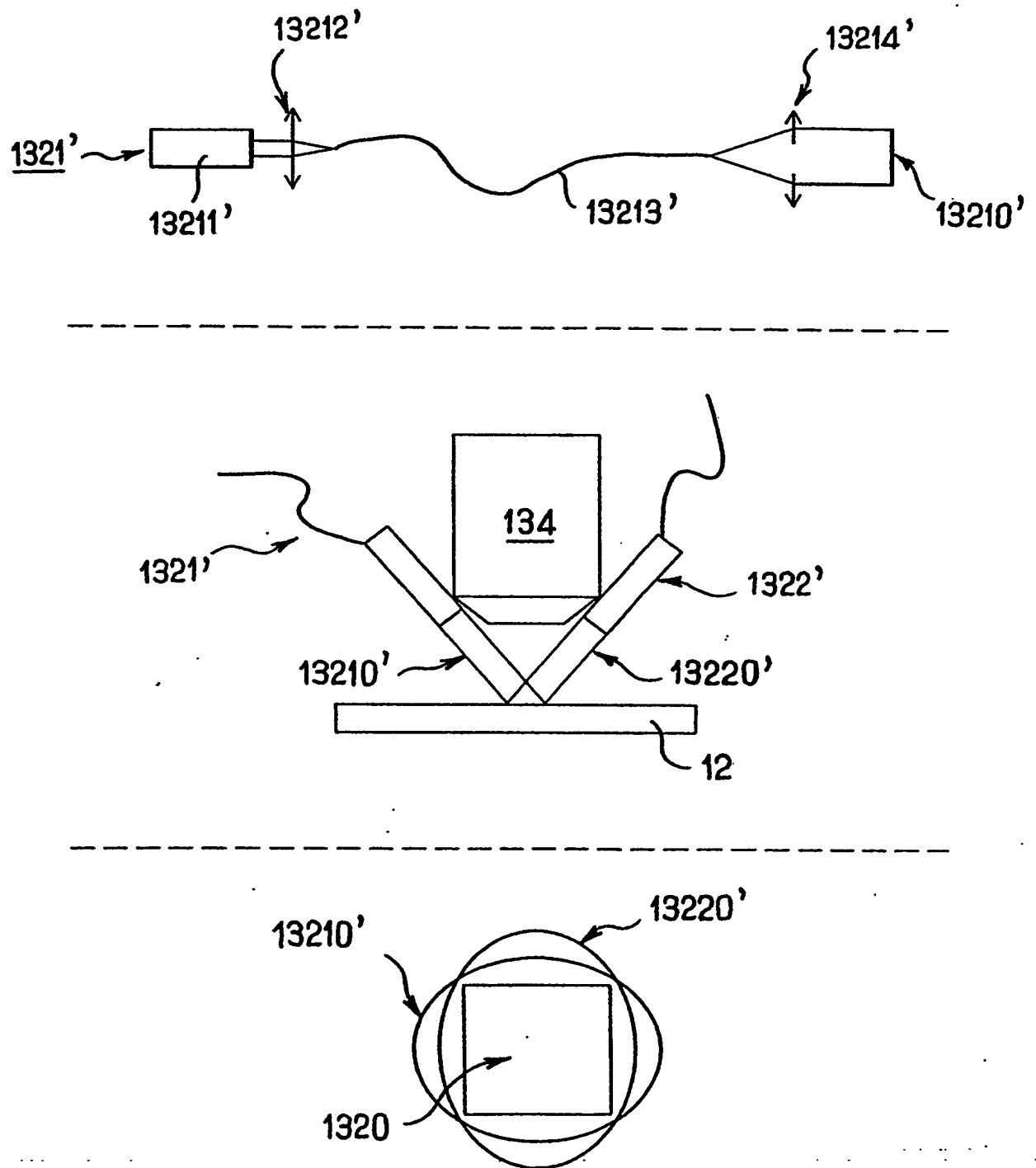


FIG.3b

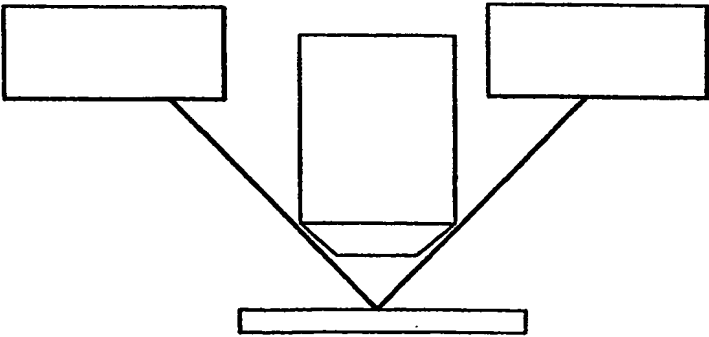
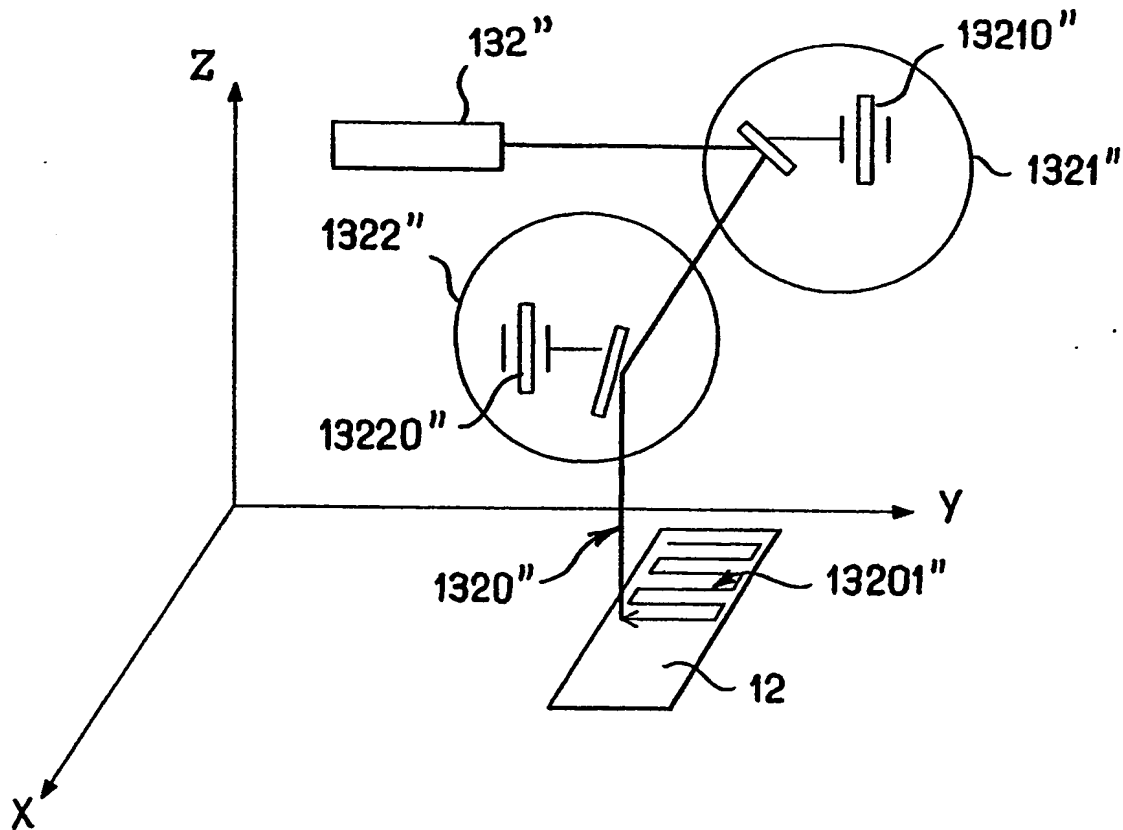
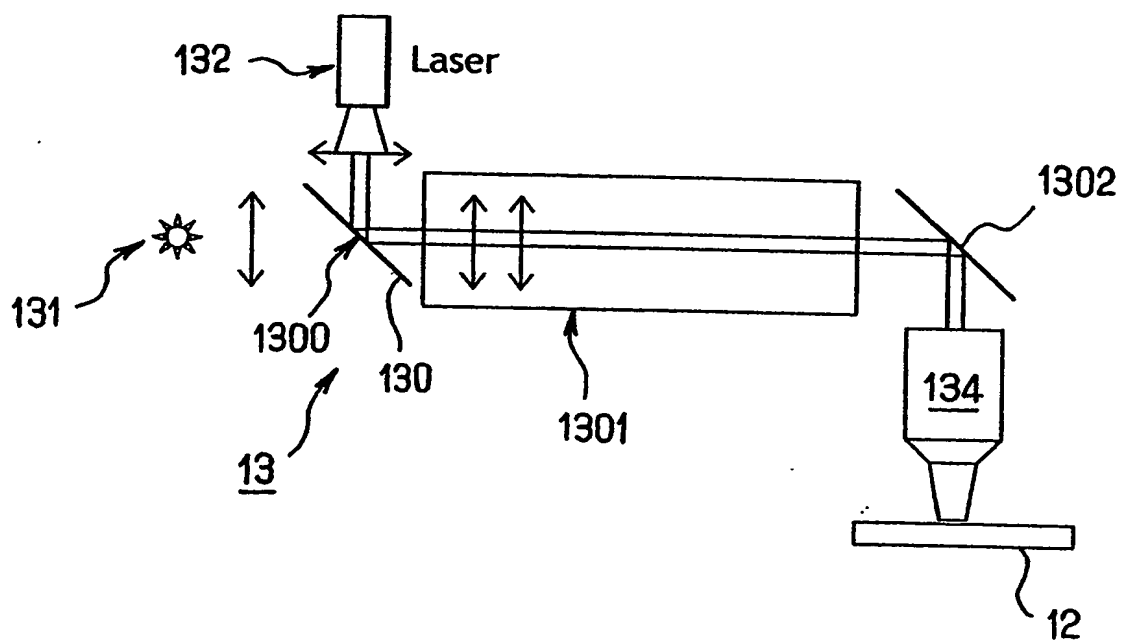
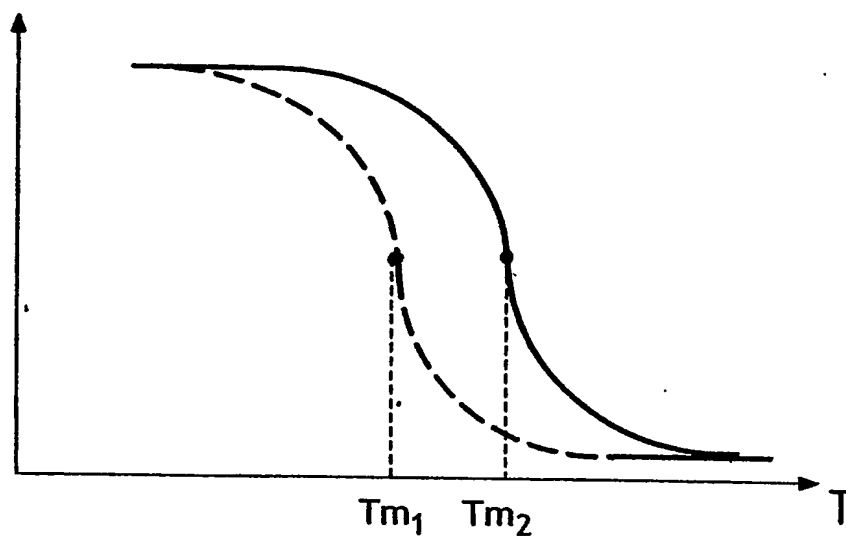
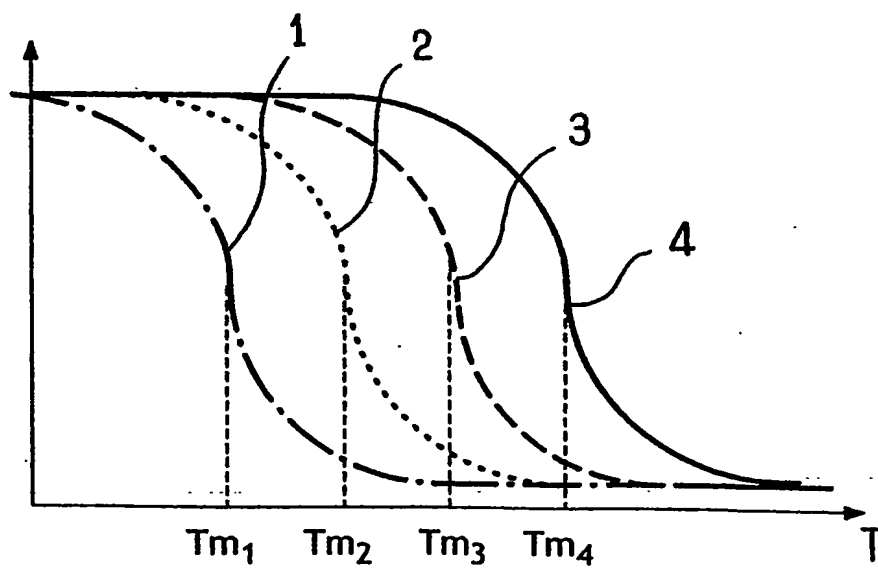


FIG.3c

6/11

FIG.3d

7/11

FIG.4aFIG.4b

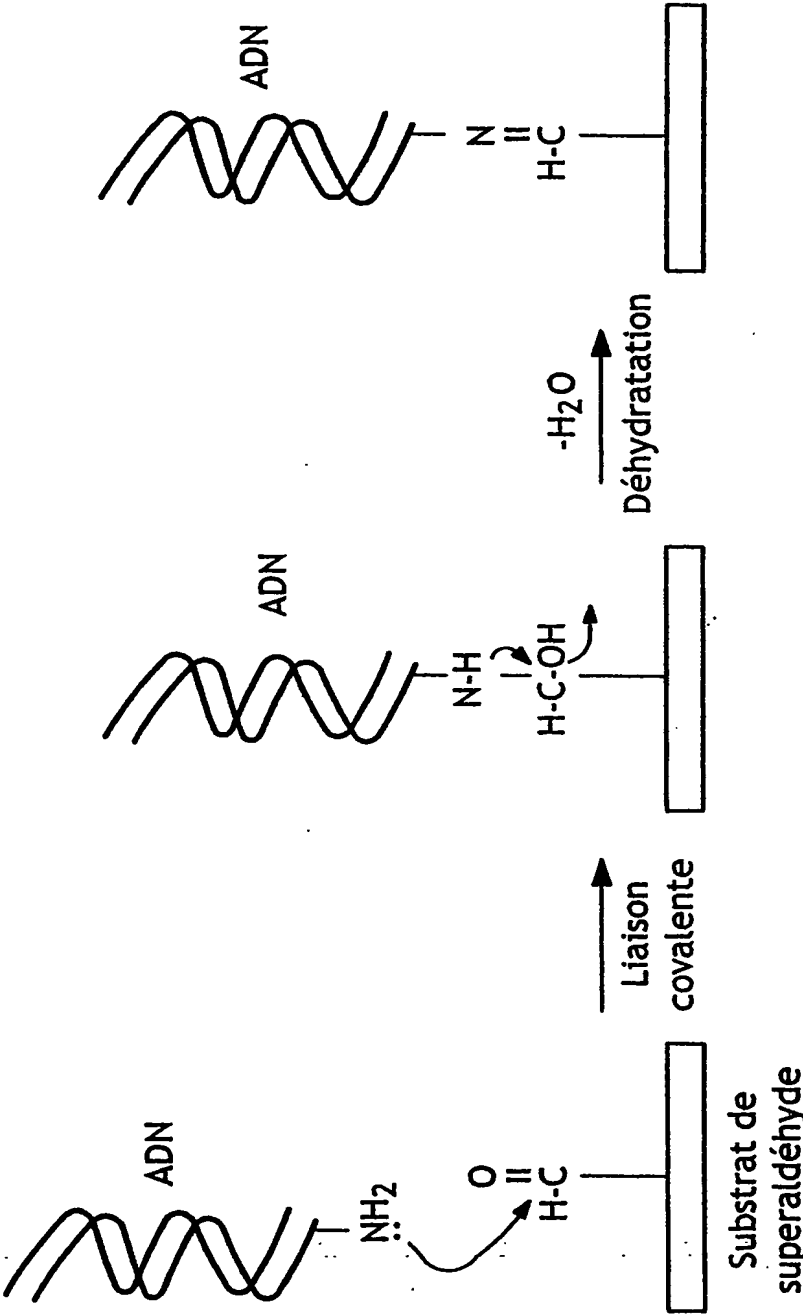


FIG.5

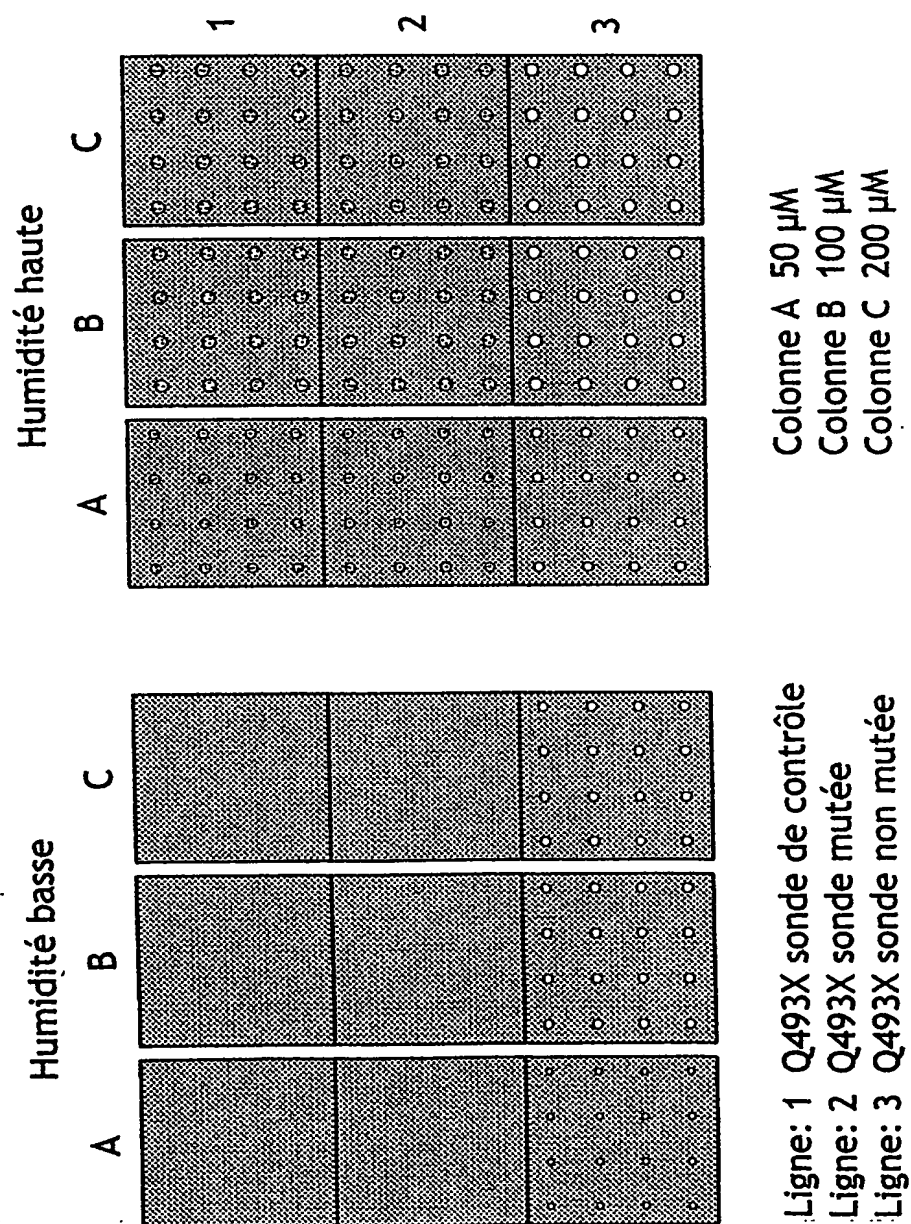


FIG. 6

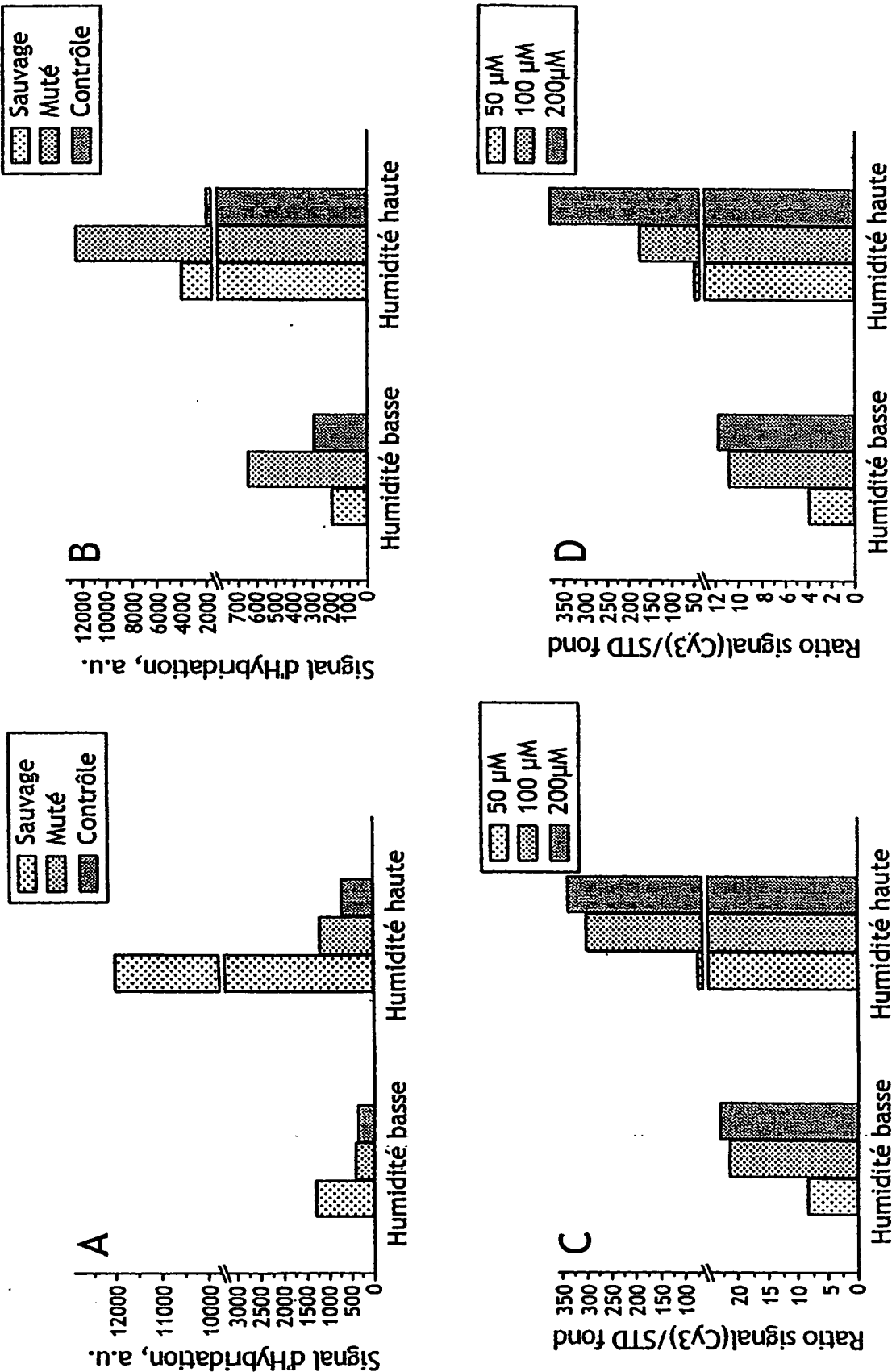


FIG.7

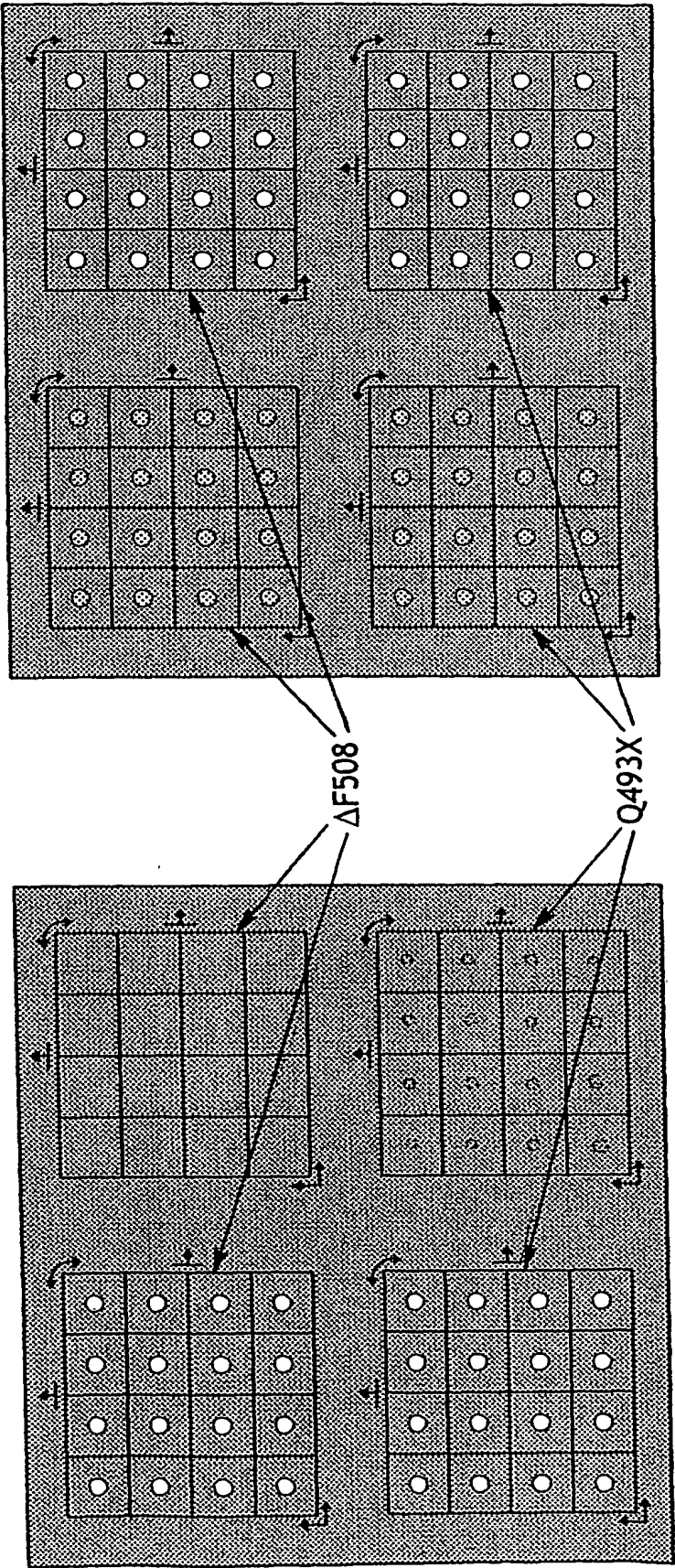


FIG.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|--|
| Y | US 6 329 661 B1 (PEROV ALEXANDER ET AL) 11 December 2001 (2001-12-11) cited in the application * colonne 2, ligne 38 - colonne 3, ligne 55; figure 1 * | 1-4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 17-19, 21 |
| Y | US 5 631 734 A (STERN DAVID ET AL) 20 May 1997 (1997-05-20) * colonne 4, ligne 39 - colonne 5, ligne 43; colonne 10, lignes 39-43; figure 1A * | 1-4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 17-19, 21 23-33 |
| A | --- | --- |
| | --- -- | --- |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2004

Date of mailing of the international search report

10/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoogen, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03886

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------------------|
| Y A | US 6 160 618 A (GARNER HAROLD R) 12 December 2000 (2000-12-12) * colonne 2, lignes 46-67; colonn 4, ligne 55 - colonne 5, ligne 23; colonne 6, lignes 45-53; colonne 11, lignes 37-45; figures 1 et 8 * | 2-4,6, 13,14 5,12,15, 16 |
| Y A | US 6 071 748 A (MARQUISS SAMUEL A ET AL) 6 June 2000 (2000-06-06) * colonne 7, ligne 6 - colonne 8, ligne 67; colonne 10, lignes 24-38; figure 3 * | 2-4,8, 13,14 9,12,15, 16 |
| Y | US 6 407 395 B1 (PEROV ALEXANDER ET AL) 18 June 2002 (2002-06-18) * colonne 3, lignes 8-14 * | 3 |
| Y | WO 01/63245 A (CASSELLS JOHN ;DISLEY DARRIN (GB); MARTIN PAUL (GB); TECHNOLOGY PA) 30 August 2001 (2001-08-30) * page 6, lignes 34-37; figure 1 * | 10,11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03886

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 6329661 | B1 | 11-12-2001 | WO 0165241 A1 | 07-09-2001 |
| US 5631734 | A | 20-05-1997 | WO 9522058 A1 | 17-08-1995 |
| | | | US 2003017081 A1 | 23-01-2003 |
| | | | US 2003152490 A1 | 14-08-2003 |
| | | | US 2004048362 A1 | 11-03-2004 |
| | | | US 6141096 A | 31-10-2000 |
| US 6160618 | A | 12-12-2000 | NONE | |
| US 6071748 | A | 06-06-2000 | US 6025985 A | 15-02-2000 |
| | | | AU 1518499 A | 24-05-1999 |
| | | | AU 2344899 A | 09-08-1999 |
| | | | AU 2775899 A | 06-09-1999 |
| | | | AU 3649199 A | 08-11-1999 |
| | | | AU 8485398 A | 10-02-1999 |
| | | | EP 1012579 A2 | 28-06-2000 |
| | | | EP 1032813 A2 | 06-09-2000 |
| | | | EP 1060384 A1 | 20-12-2000 |
| | | | EP 1071942 A1 | 31-01-2001 |
| | | | JP 2002509235 T | 26-03-2002 |
| | | | JP 2003521670 T | 15-07-2003 |
| | | | JP 2003526077 T | 02-09-2003 |
| | | | JP 2003526767 T | 09-09-2003 |
| | | | US 2002056803 A1 | 16-05-2002 |
| | | | US 2002158212 A1 | 31-10-2002 |
| | | | WO 9904228 A2 | 28-01-1999 |
| | | | WO 9923466 A2 | 14-05-1999 |
| | | | WO 9937203 A2 | 29-07-1999 |
| | | | WO 9942817 A1 | 26-08-1999 |
| | | | WO 9954711 A1 | 28-10-1999 |
| | | | US 2001021074 A1 | 13-09-2001 |
| | | | US 6033100 A | 07-03-2000 |
| | | | US 6159425 A | 12-12-2000 |
| | | | US 6499366 B1 | 31-12-2002 |
| | | | US 6187267 B1 | 13-02-2001 |
| | | | US 6097025 A | 01-08-2000 |
| | | | US 6488892 B1 | 03-12-2002 |
| | | | US 6297018 B1 | 02-10-2001 |
| | | | US 6469311 B1 | 22-10-2002 |
| | | | US 6326605 B1 | 04-12-2001 |
| | | | US 2001007640 A1 | 12-07-2001 |
| | | | US 6258326 B1 | 10-07-2001 |
| US 6407395 | B1 | 18-06-2002 | NONE | |
| WO 0163245 | A | 30-08-2001 | AU 3396401 A | 03-09-2001 |
| | | | EP 1257804 A2 | 20-11-2002 |
| | | | WO 0163245 A2 | 30-08-2001 |
| | | | JP 2003524177 T | 12-08-2003 |
| | | | US 2003100024 A1 | 29-05-2003 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem ● Internationale No

PCT/FR 03/03886

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N21/64

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---|--|
| Y | US 6 329 661 B1 (PEROV ALEXANDER ET AL) 11 décembre 2001 (2001-12-11) cité dans la demande * colonne 2, ligne 38 - colonne 3, ligne 55; figure 1 * | 1-4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 17-19, 21 |
| Y | US 5 631 734 A (STERN DAVID ET AL) 20 mai 1997 (1997-05-20) * colonne 4, ligne 39 - colonne 5, ligne 43; colonne 10, lignes 39-43; figure 1A * | 1-4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 17-19, 21 23-33 |
| A | --- | --- |
| | --- -/-- | |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 avril 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/05/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hoogen, R

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 03/03886

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-----------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| Y A | US 6 160 618 A (GARNER HAROLD R) 12 décembre 2000 (2000-12-12) * colonne 2, lignes 46-67; colonn 4, ligne 55 - colonne 5, ligne 23; colonne 6, lignes 45-53; colonne 11, lignes 37-45; figures 1 et 8 * | 2-4,6, 13,14 5,12,15, 16 |
| Y A | US 6 071 748 A (MARQUISS SAMUEL A ET AL) 6 juin 2000 (2000-06-06) * colonne 7, ligne 6 - colonne 8, ligne 67; colonne 10, lignes 24-38; figure 3 * | 2-4,8, 13,14 9,12,15, 16 |
| Y | US 6 407 395 B1 (PEROV ALEXANDER ET AL) 18 juin 2002 (2002-06-18) * colonne 3, lignes 8-14 * | 3 |
| Y | WO 01/63245 A (CASSELLS JOHN ;DISLEY DARRIN (GB); MARTIN PAUL (GB); TECHNOLOGY PA) 30 août 2001 (2001-08-30) * page 6, lignes 34-37; figure 1 * | 10,11 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 03/03886

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|----|------------------------|---|---------------|------------------------|
| US 6329661 | B1 | 11-12-2001 | WO | 0165241 A1 | 07-09-2001 |
| US 5631734 | A | 20-05-1997 | WO | 9522058 A1 | 17-08-1995 |
| | | | US | 2003017081 A1 | 23-01-2003 |
| | | | US | 2003152490 A1 | 14-08-2003 |
| | | | US | 2004048362 A1 | 11-03-2004 |
| | | | US | 6141096 A | 31-10-2000 |
| US 6160618 | A | 12-12-2000 | AUCUN | | |
| US 6071748 | A | 06-06-2000 | US | 6025985 A | 15-02-2000 |
| | | | AU | 1518499 A | 24-05-1999 |
| | | | AU | 2344899 A | 09-08-1999 |
| | | | AU | 2775899 A | 06-09-1999 |
| | | | AU | 3649199 A | 08-11-1999 |
| | | | AU | 8485398 A | 10-02-1999 |
| | | | EP | 1012579 A2 | 28-06-2000 |
| | | | EP | 1032813 A2 | 06-09-2000 |
| | | | EP | 1060384 A1 | 20-12-2000 |
| | | | EP | 1071942 A1 | 31-01-2001 |
| | | | JP | 2002509235 T | 26-03-2002 |
| | | | JP | 2003521670 T | 15-07-2003 |
| | | | JP | 2003526077 T | 02-09-2003 |
| | | | JP | 2003526767 T | 09-09-2003 |
| | | | US | 2002056803 A1 | 16-05-2002 |
| | | | US | 2002158212 A1 | 31-10-2002 |
| | | | WO | 9904228 A2 | 28-01-1999 |
| | | | WO | 9923466 A2 | 14-05-1999 |
| | | | WO | 9937203 A2 | 29-07-1999 |
| | | | WO | 9942817 A1 | 26-08-1999 |
| | | | WO | 9954711 A1 | 28-10-1999 |
| | | | US | 2001021074 A1 | 13-09-2001 |
| | | | US | 6033100 A | 07-03-2000 |
| | | | US | 6159425 A | 12-12-2000 |
| | | | US | 6499366 B1 | 31-12-2002 |
| | | | US | 6187267 B1 | 13-02-2001 |
| | | | US | 6097025 A | 01-08-2000 |
| | | | US | 6488892 B1 | 03-12-2002 |
| | | | US | 6297018 B1 | 02-10-2001 |
| | | | US | 6469311 B1 | 22-10-2002 |
| | | | US | 6326605 B1 | 04-12-2001 |
| | | | US | 2001007640 A1 | 12-07-2001 |
| | | | US | 6258326 B1 | 10-07-2001 |
| US 6407395 | B1 | 18-06-2002 | AUCUN | | |
| WO 0163245 | A | 30-08-2001 | AU | 3396401 A | 03-09-2001 |
| | | | EP | 1257804 A2 | 20-11-2002 |
| | | | WO | 0163245 A2 | 30-08-2001 |
| | | | JP | 2003524177 T | 12-08-2003 |
| | | | US | 2003100024 A1 | 29-05-2003 |